Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNGEN ZUR EMBRYOTOXIZITÄT VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN BEIM KANINCHEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Georg Krengel

1978

1979

UNTERSUCHUNGEN ZUR EMBRYOTOXIZITÄT VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN BEIM KANINCHEN

HANS-GEORG KRENGEL

Düsseldorf 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. R ö h r b o r n)

UNTERSUCHUNGEN ZUR EMBRYOTOXIZITÄT VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN BEIM KANINCHEN

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Hans-Georg Krengel

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Wirth

IN DANKBARKEIT UND LIEBE

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. E I N L E I T U N G..... 1

2. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T..... 3

2.1 Entwicklung vom Senfgas zum Cyclophosphamid..... 3

2.1.1 Die Erstsynthese des Senfgases..... 3

2.1.1.1 Chemische Eigenschaften der Senfgase..... 4

2.1.1.2 Biologische Wirkung der Senfgase..... 5

2.1.1.3 Klinische Anwendung der Senfgase..... 8

2.1.1.4 Embryotoxizität der Senfgase..... 10

2.1.2 Die Erstsynthese von Cyclophosphamid... 12

2.2 Klinische Anwendung von Cyclophosphamid..... 15

2.2.1 Das Zytostatikum..... 15

2.2.2 Das Immunsuppressivum..... 16

2.3 Pharmakologie von Cyclophosphamid..... ... 17

2.3.1 Chemische Eigenschaften..... 17

2.3.2 Pharmakokinetik beim Säuger..... 18

2.3.2.1 Resorption und Ausscheidung..... 18

2.3.2.2 Metabolismus..... 23

2.4 Toxikologie von Cyclophosphamid..... 28

2.4.1 Kanzerogenität und Mutagenität von Cyclophosphamid..... 28

2.4.2 Embryotoxizität von Cyclophosphamid.... 31

2.4.2.1 Beim Hühnchen..... 31

2.4.2.2 Bei der Maus..... 33

2.4.2.3 Bei der Ratte..... 37

2.4.2.4 Beim Kaninchen..... 40

2.4.2.5 Beim Menschen..... 42

3. P R O B L E M A T I K der embryotoxischen Wirkung von Cyclophosphamid..... 46

Seite

4. M A T E R I A L und M E T H O D E..... 50

4.1 Versuchsaufbau und Übersicht..... 50

4.2 Bestimmungen von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen.... 52

4.2.1 Dünnschichtchromatographische Trennung von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten..... 53

4.2.2 Quantitative Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten mit dem NBP-Test... 57

4.2.3 Fluorimetrische Bestimmung des Cyclophosphamid-Metaboliten Acrolein im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit beim Kaninchen... 60

4.3 Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Keimanlagenmaterial nach direkter Applikation in den Dottersack..... 62

4.4 Direkte Untersuchung zur Embryotoxizität von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode beim Kaninchen..... 63

4.4.1 Applikation von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode..... 63

4.4.2 Beurteilung der Feten auf Mißbildungen. 66

4.4.3 Versuchsauswertung und Statistik..... 68

5. E R G E B N I S S E..... 70

5.1 Ergebnisse nach Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation..... 70

5.2 Ergebnisse nach Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Keimanlagenmaterial nach Applikation von Cyclophosphamid in den Dottersack des Kaninchens am 9. Tag der Gestation..... 86

5.3 Ergebnisse nach Testung von Cyclophosphamid auf Embryotoxizität mit der Dottersackmethode 88

Seite

6. D I S K U S S I O N..... 93

6.1 Cyclophosphamid und seine Metabolite im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen..... 93

6.2 Embryotoxizität von Cyclophosphamid nach Testung mit der Dottersackmethode..... 98

6.3 Mögliche embryotoxische Wirkmechanismen von Cyclophosphamid..... 101

7. Z U S A M M E N F A S S U N G..... 104

8. L I T E R A T U R..... 106

1. EINLEITUNG

In der heutigen Zeit nimmt die Bedeutung zu, größere Kenntnisse über Nebenwirkungen und Kontraindikationen von Pharmaka zu besitzen, um sich und andere nicht durch bestechende Therapieerfolge einer nachhaltigen Schädigung auszusetzen. Dies gilt besonders bei Gabe von Medikamenten, bewußt oder unbewußt, zu Beginn oder während einer Schwangerschaft. Aus diesem Grunde beschäftigt sich die Teratologie damit, Substanzen auf ihre fruchtschädigende Wirkung zu untersuchen. Weiterhin befaßt sich die Teratologie mit der Aufdeckung von Mechanismen, über welche die Substanzen auf den Keim schädigend wirken können.

Das Zytostatikum Cyclophosphamid wurde in zahlreichen Untersuchungen als stark embryotoxisch wirksam beschrieben, so daß es zum Teratogen der Klasse I erhoben wurde und selbst zur Erfassung von sensiblen Phasen in der Keimentwicklung Verwendung fand (v. KREYBIG, 1965). Trotzdem besteht Unklarheit über das embryotoxische Wirkprinzip dieser Substanz. Einige Autoren fanden keine, andere nur geringe Embryotoxizität bei Applikation von Cyclophosphamid beim Muttertier. Cyclophosphamid in unverändertem Zustand muß erst im Organismus aktiviert werden, um seine eigentliche Wirkung entfalten zu können. Dabei entstehen Metabolite mit unterschiedlichem pharmakologischen Verhalten. Diese Metabolite und die Art ihrer Entstehung machen die therapeutischen Vorteile von Cyclophosphamid gegenüber anderen Senfgasabkömmlingen aus, sie erschweren jedoch durch ihre Vielzahl die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen. Einige von ihnen besitzen wie der Präkursor, das Senfgas, alkylierende Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Cyclophosphamid und seine bisher bekannten Metabolite in der Lage sind, in die Keimanlage des Kaninchens am 9. Tag der Gestation einzudringen. Ferner sollte die embryotoxische Wirkung von unverändertem Cyclophosphamid ebenfalls am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen mit der Dottersackmethode untersucht werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Entwicklung vom Senfgas zum Cyclophosphamid

2.1.1 Die Erstsynthese des Senfgases

Die Geschichte des Cyclophosphamids beginnt mit der Entdeckung des Vorläufers, dem Senfgas, im Jahre 1886 durch Viktor MEYER, dem an der Universität Göttingen die Synthese des Schwefeldichlorethans durch Reaktion von Kaliumsulfid mit Chlorglycol und Phosphortrichlorid gelang:

$$K_2S + 2\ CH_2ClCH_2OH \longrightarrow S(CH_2CH_2OH)_2 + 2\ KCl$$

$$S(CH_2CH_2OH)_2 + PCl_3 \longrightarrow S(CH_2CH_2Cl)_2$$

Das Zwischenprodukt, das Thioglycol, ist atoxisch. Dagegen zeigte das ß,ß'-chlorierte Produkt, das Schwefeldichlorethan, bei einem von V. Meyers Assistenten livide Hauterscheinungen und eine vorübergehende Augenrötung. Weil V. MEYER an eine allergische Reaktion dachte, ließ er den Stoff am Physiologischen Institut der gleichen Universität an Kaninchen testen. Die Kaninchen zeigten bei drei- bis vierstündiger Begasung mit diesem Stoff Exzitationserscheinungen, Rötung der Schnauze und Hustenreiz. Am folgenden Tag waren die Augen der Tiere mit Eiter verschlossen und ihre Ohren waren geschwollen. Nach drei Tagen verstarben die Kaninchen an einer schweren bilateralen Pneumonie. Die Versuche wurden bald abgebrochen, weil die Substanz auch auf die an den Versuchen beteiligten Personen toxisch wirkte.

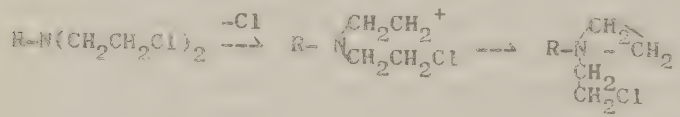
Im Juli 1917 setzte das Deutsche Militär das Schwefeldichlorethan als Kampfgas vor Ypres/Belgien ein. Von den Franzosen wurde die Substanz deshalb Yperite genannt und des Geruchs wegen auch als Senfgas bezeich-

net. Nach den Herstellern LOmmel und STeinkopf bekam das Senfgas den gebräuchlichen Namen Lost.

WARD (1938) synthetisierte das azotierte Senfgas, das Stickstofflost. Vom 1939 bis 1945 wurden diese Senfgase in vielfältigen Arbeiten in England und den USA getestet. Die bis dahin geheimgehaltenen Ergebnisse veröffentlichten 1946 GILMAN und PHILIPS sowie DIXON und MERNHAM. ROSS publizierte 1953 eine komplette Studie über die physikochemischen Eigenschaften der Senfgase.

2.1.1.1 Chemische Eigenschaften der Senfgase

In seiner Studie beschrieb Ross sowohl die sulfarierten als auch die azotierten Senfgase. In eine polare Lösung gebracht erhalten die Substanzen ihre physiologische Wirkung durch intramolekulare Ringbildung zu einem instabilen Carboniumion, dem Äthylensulfonium bzw. dem Äthylenimonium.

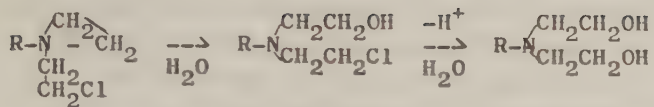


ein Stickstoff-lostderivat	ein Äthylenimonium	ein cyclisches Äthylenimonium

Diese Reaktion ist abhängig von der Basizität des Zentralatoms (N bzw. S) und der Länge der R-Kette.

Da zu dieser Zeit bereits eine große Anzahl von Senfgasen synthetisiert worden waren, stellte man fest, daß mit zunehmendem Hydrolysebestreben die antitumorale Aktivität der einzelnen Senfgase steigt. In einer wässrigen Lösung kommt es zur Hydrolyse, so daß bei physiologischem pH das Kation mit dem

Wasser reagiert:



ein cyclisches Äthylenimonium — 1. Hydrolyse — 2. Hydrolyse

Wenn außer H_2O alkylierbare Substanzen anwesend sind, kommt es zu einer kompetitiven Reaktion. Zu den funktionell alkylierbaren Gruppen gehören die α-Amino-, Imidazol-, Sulfhydril-, Sulfur-, Phenol-amino- und Carboxyl-Gruppen der Aminosäuren und der Proteine. Weil die Senfgase extrem reaktiv sind, konnte man trotz aller Untersuchungen noch nicht genau ihren Wirkungsmechanismus und ihre Toxizität auf die lebende Zelle erklären.

2.1.1.2 Biologische Wirkung der Senfgase

HERMANN (1918) und KRUMBHAAR (1919) stellten bei Soldaten, die Senfgas eingeatmet hatten fest, daß die eigentliche Todesursache eine Bronchopneumonie war. Ferner entdeckten sie hierbei nach einer beginnenden Leukozytose eine persistierende Leukopenie, begleitet von einer mäßigen Anämie und Thrombozytopenie.

SOLLMANN (1919) beobachtete an Freiwilligen bei Bedampfung der Haut mit Senfgas unterschiedliche Empfindlichkeitsreaktionen.

PAPPENHEIMER und VANCE bestätigten 1920 diese pathologischen Effekte nach Begasung von Kaninchen mit Senfgas und nach intravenöser Gabe von 5 mg/kg. Sie fanden die bereits von V. MEYER beschriebenen Symptome an der Haut und am Bronchialsystem. Ferner

beschrieben sie Konjunktivitiden und Oberflächennekrosen der Kornea. Nach einer gewissen Latenzzeit zeigten die Tiere eine intensive Speichelsekretion, Erbrechen und blutige Diarrhoen. Sie gaben sich übererregt, lebhaft in ungeordneten Bewegungen und zeigten Konvulsionen mit Rückwerfen des Kopfes und Spastizität der Glieder. Ihr Puls war langsam und unregelmäßig; ihre Zentraltemperatur sank ab. Die angewandte Dosis (5mg/kg) war nach 24 Stunden letal und verursachte Lungenödeme und hämorrhagische Diathesen ins Intestinum.

BERENBLUM (1939) untersuchte hautirritierende Stoffe, um auf Mäusen die Entwicklung von Hauttumoren zu begünstigen. Senfgas verursachte jedoch außer einer Hyperämie der Haut weder Ulcerationen noch tumorartige Gebilde. Wiederholte Anwendung von 0,1 %iger Senfgaslösung verhinderte sogar die Tumorinduktion durch Teer.

Die Hypothese einer direkten Reaktion zwischen Teer und Senfgas wies BERENBLUM 1931 zurück. Nach Bestreichen der Haut mit Teer und anschließender Senfgasinjektion blieb nämlich das Tumorwachstum bei Mäusen weiterhin gehemmt. Folglich verläuft die Wirkung des Senfgases über den Tierorganismus. Ferner stellte er fest, daß es keine vorbeugende Wirkung besitzt und unfähig sei, das Wachstum eines bereits vorhandenen Tumors zu verhindern.

BERENBLUM (1935) folgerte, daß dem Senfgas ähnliche Stoffe gleiche Wirkung haben könnten. Darum untersuchten BERENBLUM, KENDALL und ORR (1936) verschiedene Senfgase an Jensensarkomschnitten, Kaninchenleber und Hühnchenembryonen. Einige Senfgase vermochten die Zellatmung mehr als die Glykolyse zu hemmen und somit auch das tumoröse Wachstum.

NEEDHAM, COHEN und BARETT (1943) fanden, daß die Stärke der Glykolyseinhibition im Knochenmark nach Injektion von Senfgas parallel läuft mit dem Erscheinen histologischer Schäden. Nach parenteraler Applikation einer letalen Dosis wurde eine signifikante Hemmung der anaeroben Glykolyse und der Atmung in verschiedenen Organschnitten festgestellt. Außerdem beobachteten sie eine Hemmung der Glykogensynthese in der Leber und der intestinalen Glucoseabsorption. Die Tatsache, daß verschiedene Zellarten senfgasempfindlicher sind, bestärkte die These, daß die Inaktivierung essentieller intrazellulärer Enzyme als primärer Wirkungsmechanismus anzusehen ist.

SHE und CORI (1946) fanden, daß Phosphokinasen besonders empfindlich auf Senfgase reagieren.

DARLINGTON und KOLLER zeigten 1947, daß sehr geringe Dosen azotiertes Senfgas, die weder die Glykolyse noch die Phosphokinaseenzyme beeinflußten, auf den Kern wirkten. Sie vermuteten, daß wahrscheinlich das Zentromer die meist empfindliche Angriffstelle sei.

FELL und ALLSOPP (1948) beobachteten bei geringer Dosierung von Senfgas Veränderungen der Mitose in ihren Zellkulturen, wie verschiedenartige Brüche und Fusionen sowie verspätete Migration der Chromosomen.

ELMORE, GULLAND, JORDAN und TAYLOR (1948) führten an, daß Senfgas unter physiologischen Bedingungen mit Nukleinsäuren, im Besonderen Guanin reagieren kann, denn die analysierten Nukleinsäuren enthielten Schwefelverbindungen. Elektrometrische Titrationen brachten Senfgasverbindungen mit primären und sekundären Phosphorylgruppen der DNS zum Vorschein. Die Hydroxylgruppen der Purin und Pyrimidinderivate reagieren nur unter besonderen Bedingungen.

LOWRENCE und CARTER beschrieben 1950, daß bei einmaliger Injektion einer Senfgaslösung der Einbau von P^{32} in die Nukleinsäuren des Knochenmarks der Ratte und des Thymus des Kaninchens gehemmt wird, sich aber nach zwei bis vier Tagen wieder normalisiert.

GOLDTWAIT (1952) differenzierte das Ergebnis dahingehend, daß der Einbau von C^{14}-Formiat und N^{15}-Adenin in die DNS durch Senfgase vermindert wird, in die RNS dagegen normal verläuft.

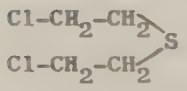
2.1.1.3 Klinische Anwendung der Senfgase

Der Effekt der Senfgase auf schnell proliferierende Gewebe und im besonderen auf das hämatopoetische System lieferte den Anstoß dazu, diese Verbindungen klinisch anzuwenden, um neoplastisches Wachstum einzudämmen. Die ersten klinischen Erfahrungen wurden veröffentlicht von GILMAN und PHILIPS (1946), GOODMAN, WINTROBE, DAMESHEK, GOODMAN, GILMAN und Mc LENNAN (1946), RHOADS (1946), JACOBSON, SPURR, BARRON, SMITH, LOMBAUGH und DICK (1946), KARNOFSKY, ABELMANN, CRAVER und BURCHENAL (1948), WINTROBE und HUGULEY (1948).

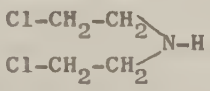
BURCHENAL, LESTER, RILEY und RHOADS (1948) verglichen die Aktivität der damals bekannten Senfgase in verschiedenen Tests: auf Gewebekulturen von normalem und neoplastischen Wachstum, auf Chorionallantoismembran vom Hühnchen geimpfte menschliche Tumorgewebsstückchen, auf Tumortransplantate und Leukämiezellkulturen der Maus. Dabei stellten sie fest, daß Monoalkylamine des Typs $R\text{-}NH(CH_2CH_2Cl)$ praktisch ohne Effekt, die Dialkylamine des Typs $R\text{-}N(CH_2CH_2Cl)_2$ sehr wirksam, die des Typs $R_1R_2N\text{-}(CH_2CH_2Cl)_2$ ohne Aktivität, die Diamine des Typs $(ClCH_2CH_2)_2\text{-}N\text{-}R\text{-}N\text{-}(CH_2CH_2Cl)_2$ besonders wirkungsvoll sind.

Die Senfgase fanden lange Zeit Anwendung bei leukämischen Erkrankungen und bei der Lymphogranulomatose. Leider ist die zytostatische Aktivität der Senfgase nicht spezifisch gerichtet. Ein großer Teil der Senfgasderivate ist in der zytostatischen Therapie auch heute noch vertreten.

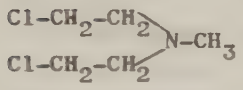
Abbildung 1 : SENFGAS UND SEINE DERIVATE



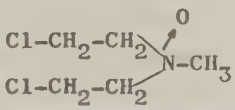
Senfgas



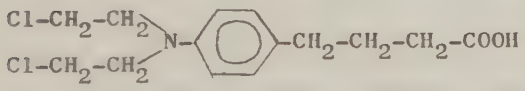
Nor-Stickstofflost



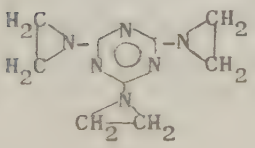
Chlormethin
Stickstofflost^{R}
Mustargen^{R}



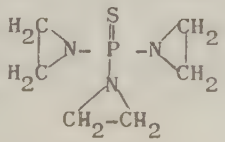
N-Oxid-Lost
Mitomen^{R}



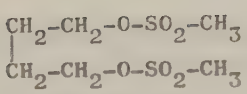
Chlorambucil
Triäthylenmelamin^{R}, Leukeran^{R}



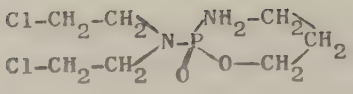
Tretamin



ThioTEPA



Busulfan
Myleran^{R}



Cyclophosphamid
Endoxan^{R}

2.1.1.4 Embryotoxizität der Senfgase

Die ersten Versuche zur Embryotoxizität wurden von GILMAN und PHILIPS (1946) an Invertebraten und phylogenetisch niedrig stehenden Vertebraten durchgeführt. Nachdem Seeigeleier kurzzeitig in eine Senfgaslösung sehr niedriger Konzentration getaucht worden waren, beobachteten sie eine gestörte oder verzögerte Segmentation.

GILETTE und BODENSTEIN (1946) tauchten Embryonen von Ambyostoma punctatum (Salamander) für 45 Minuten in eine 0,001 %ige Lösung Stickstofflost und stellten daraufhin eine Wachstumsverzögerung fest. Histologische Gewebsschnitte zeigten, daß die Entwicklung des Mesenchyms, der Knorpelbildner für die Extremitäten, nach 7 Tagen stark gehemmt wurde. Die Größe der Leberzellen und deren Kerne nahm zu. Der Mitoseablauf war unauffällig.

KARNOFSKY, BURCHENAL, ORMSBEE, CORNMAN und RHOADS (1947) versuchten das Wachstum von experimentell auf die Chorionallantoismembran des Hühnchens gebrachten Tumoren durch Injektion von Senfgas in das Ei zu hemmen und beschrieben dabei die embryotoxische Wirkung. Die Injektion am 3. Tag ergab Anomalien am Schnabel und Mikromelien. Die LD_{50} betrug am 3. Tag 0,015 mg/Ei, am 12. Tag nur noch 0,5 mg/Ei.

SALZGEBER (1962 und 1963) behandelte Hühnchenembryonen im Alter von 2-3 Tagen mit 0,6 bis 2 µg Senfgas. Es wurden fast ausschließlich teratogene Effekte auf die Entwicklung der Extremitäten beobachtet; 91 % der Tiere zeigten entsprechende Mißbildungen. Außerdem hatten 26 von 107 Embryonen eine Halsskoliose und 4 davon trugen Augenmißbildungen. In einer weiteren Untersuchung zeigten 15 von 28 Embryonen bei gleicher Versuchsanordnung intersexuelle Veränderungen. Der rechte Testikel war als Ovotestis angelegt und die Zahl der Gonozyten war vermindert.

Untersuchungen zur Embryotoxizität bei Säugern wurden bevorzugt an Ratten durchgeführt. HASKIN (1948) und HETTIG, ROBERTSON und CHINE (1950) untersuchten am 12., 13. und 14. Tag der Gestation die embryotoxische Wirkung von Stickstofflost auf die fetale Skelettentwicklung der Ratte nach intraperitonealer Injektion von 0,5 mg/kg. Die Eröffnung und Examination der Feten erfolgte am 21. Tag. Die am 12. Tag der Gestation behandelten Tiere zeigten resorbierte und mazerierte Feten. Der embryotoxische Effekt erreichte sein Maximum am 13. und 14. Tag. Kurzfingrigkeit, Gaumenspalte, Occipitaldeformitäten und allgemeine Retardierungszeichen wurden am häufigsten beobachtet.

MURPHY (1960) injizierte schwangeren Ratten am 12. Tag der Gestation Chlorambucil, fand danach wenig Resorptionen, aber eine Mißbildungsrate von ca. 90 %.

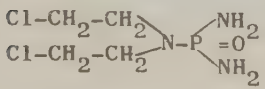
MONIE (1961) fand nach mütterlicher Applikation von Chlorambucil an Rattenfeten Anomalien des Urogenitalsystems wie fehlende Nieren und Ureteren, Hydroureter, renale Ektopien und Nekrosen, persistierende Kloake und Hermaphroditismus.

Bei der klinischen Anwendung von Senfgasabkömmlingen wie etwa dem Busulfan beschrieben mehrere Autoren irreversible aber auch reversible Amenorrhoen, wodurch eine Konzeption bei diesen Patientinnen unmöglich wurde (KENIS, HENRY, DUSTIN und TAGNON, 1956; BELOHORSKY, SIRACKY, SANDOR und KLAUBER, 1960; NETTER-LAMBERT, BOUZIGNAC und NETTER, 1963). DIAMOND, ANDERSON und Mc CREADIE (1960) dagegen berichteten über eine 39-jährige schwangere Patientin, die wegen einer Leukämie mit Busulfan behandelt wurde und ein hypotrophes Kind mit zahlreichen Mißbildungen zur Welt brachte.

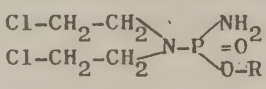
2.1.2 Die Erstsynthese von Cyclophosphamid

Obgleich die Senfgase durch ihre zytostatische Aktivität aus therapeutischer Sicht interessante Verbindungen darstellen, limitieren Toxizität und mangelnde Tumorspezifizität ihre Anwendung. Die ersten Fortschritte wurden durch die Synthese von Senfgasderivaten mit aromatischen Radikalen gemacht, die sich als weniger toxisch erwiesen.

FRIEDMAN und SELIGMAN (1954) synthetisierten phosphorylierte Substanzen, um eine gewisse Spezifität für die Krebszelle zu erreichen. Sie meinten, daß das neoplastische Gewebe reich an bestimmten Enzymen wie etwa den Phosphamidasen sei. Eine enzymatische Hydrolyse dieser Verbindungen stelle dann in der Krebszelle selbst je nach Aktivität der Phosphamidasen das Senfgas frei. Hierdurch würde der zytostatische Angriff erst in der Zelle gestartet. Sie synthetisierten verschiedene Typen von Derivaten des bis-(ß,ß'chlorethyl)-Amin:



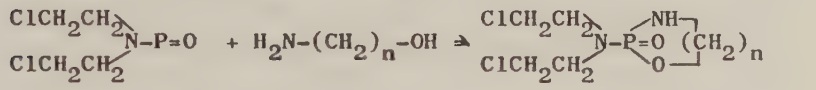
und



Phosphamid **Phosphamidester**

RUTENBERG, PERSKY, FRIEDMAN und SELIGMAN (1954) testeten diese neuen Verbindungen an der Maus und zeigten, daß die N-Phosphorylierung der Stickstofflosste die Toxizität nachweislich verringerte. Gleichzeitig ließ jedoch auch die therapeutische Wirksamkeit nach.

ARNOLD und BOURSEAUX (1958) suchten nach anderen N-phosphorylierten Derivaten des Stickstofflosts, die als Transportform inaktiv seien, jedoch im neoplastischen Gewebe durch Hydrolyse aktiviert werden sollten. Sie synthetisierten verschiedene N-bis(ß,ß'chlorethyl)-Phosphamidester, ausgehend von dem N-bis(ß,ß'chlorethyl)-Phosphamid und verschiedenkettigen Alkanolaminen:



N-(ß,ß'chlorethyl) Phosphamid — ein Alkanolamin — ein Cyclophosphamid

ARNOLD, BOURSEAUX, BROCK und WILMANS testeten noch im gleichen Jahr diese Verbindungen an der Ratte, die mit verschiedenen Tumoren, wie Yoshida-, Jensen-, Walker- und D-S-Karzinomen behaftet waren. Interessante Resultate wurden mit der Substanz B 518, dem als das Cyclophosphamid bezeichneten Pharmakon, erzielt. Es war die weitaus beste Verbindung hinsichtlich Toxizität und antitumoraler Wirksamkeit.

Einen Einblick in den chemischen Syntheseablauf gaben STEINER, ARNOLD, GRAUL, BEKEL, HUNDESHAGEN und WILMANS (1964) in ihrer Beschreibung zur Synthese von tritiummarkiertem Cyclophosphamid hoher spezifischer Radioaktivität. Folgende Abbildung erklärt die in 7 Stufen ablaufende Synthese:

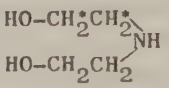
Abbildung 2 : SYNTHESE VON H^3-CYCLOPHOSPHAMID

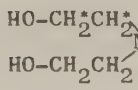
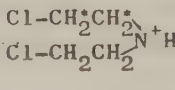
1. $H_2^*O + PBr_5 \longrightarrow POBr_3 + 2\ H^*Br$

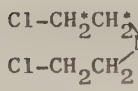
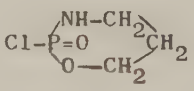
2. $2\ H^*Br + CH{=}CH \longrightarrow Br{-}CH^*H{-}CH^*H{-}Br$

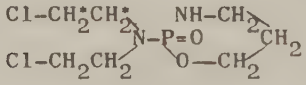
3. $Br{-}CH_2^*CH_2^*{-}Br + Zn \longrightarrow CH_2^*{=}CH_2^* + ZnBr_2$

4. $CH_2^*{=}CH_2^* + HOCl \longrightarrow HO{-}CH_2^*CH_2^*{-}Cl$

5. $HO{-}CH_2^*CH_2^*{-}Cl + HO{-}CH_2CH_2{-}NH_2 \longrightarrow$ 

6.  $+\ 2\ SOCl \longrightarrow$ 

7.  $+$  $\xrightarrow[(C_2H_5)_3N]{}$



Das Cyclophosphamid wurde zuerst durch die Chemischen Werke ASTA, Bielefeld-Brackwede, als Endoxan^R auf den Markt gebracht. In vielen anderen Ländern aber ist es unter den Namen Cytoxan, Endoxana, Enduxan, Genoxal, Procytox und Sendoxan bekannt.

2.2 Klinische Anwendung von Cyclophosphamid

2.2.1 Das Zytostatikum

Die Behandlung bösartiger Geschwülste wird vor allem konservativ angegangen, d.h. durch eine operative und/oder eine radiologische Therapie. Die Behandlung mit Chemotherapeutika ist wegen ihrer Nebenwirkungen meist nur bei inoperablen bzw. nicht bestrahlbaren Malignomen oder aber als ergänzende Therapie gebräuchlich. Die Indikation zu einer Cyclophosphamidbehandlung stellen einerseits die malignen Systemerkrankungen wie Leukämien, Lymphogranulomatose, Lymphosarkom, Retikulosarkom und Plasmozytom, andererseits die malignen inoperablen soliden Tumore, vor allem Mamma- und Ovarialkarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Seminom, Neuroblastom und Ewing-Sarkom dar.

Der zytostatische Effekt von Cyclophosphamid wurde an einem großen Spektrum verschiedener Tiertumoren getestet (BROCK, 1958, 1973). Bei Impftumoren konnten vollkommene Heilungen erzielt werden. Gleichzeitig wurde festgestellt, daß die therapeutische Breite für Cyclophosphamid überaus groß ist. Ferner berichteten zahlreiche Untersucher, daß durch Cyclophosphamid tierspezifische und viral erzeugte Tumoren in ihrem Wachstum gehemmt oder restlos zerstört wurden.

Cyclophosphamid gehört zur Kategorie der Ruhekerngifte, ist also kein Mitosegift. Es stellt ohne Zweifel eines der wirksamsten Einzelsubstanzen dar, die auch heute noch in der Klinik zur Anwendung kommen. Die konventionelle Dosierung sieht eine tägliche Einnahme von 2-6 mg/kg Körpergewicht vor. Die gemäßigte Stoßtherapie erfolgt durch eine wöchentliche Gabe von ca. 10-15 mg/kg. Die eigentliche

Stoßtherapie, die alle vierzehn Tage verabreicht werden soll, liegt zwischen 20 und 40 mg/kg. Die ultrahohe Stoßtherapie mit 60-100 mg/kg sollte nur bei gutem Allgemeinzustand des Patienten alle vier Wochen gegeben werden. Die Art der Darreichung beschränkt sich nicht allein auf die intravenöse Injektion, sondern läßt sich wegen des speziellen Aktivierungsschemas von Cyclophosphamid auf die orale, intramuskuläre, intraperitoneale und intrapleurale Applikation ausweiten.

Die klinische Erfahrung mit Cyclophosphamid hat gezeigt, daß trotz der großen therapeutischen Breite dank der speziellen Pharmakokinetik auf Nebenwirkungen geachtet werden muß. Nach allgemein vegetativen Störungen werden beim Patienten besonders nach hohen Dosen eine Alopezie, eine hämorrhagische Zystititis sowie eine Wundheilungsstörung bzw. -verzögerung beobachtet, die vorwiegend auf die Thrombopenie zurückzuführen ist. Überhaupt ist beim Cyclophosphamid wie bei fast allen Zytostatika eine Knochenmarksdepression zu beobachten; eine ständige Blutbildkontrolle ist daher ratsam. Es empfiehlt sich zusätzlich zur zytostatischen Therapie Antibiotika zu verordnen, da Cyclophosphamid auch eine immunsuppressive Wirkung besitzt, die zur Bekämpfung hartnäckiger Autoaggressions- oder Autoimmunkrankheiten genutzt wird.

2.2.2 Das Immunsuppressivum

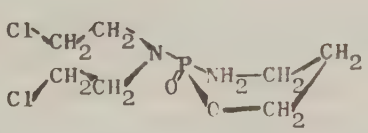
Cyclophosphamid wird auch bei den sogenannten Autoaggressionskrankheiten wie PCP, rheumatoide Arthritis, psoriatrische Arthropathie, systemischen Erythematodes, nephrotischem Syndrom und anderen mit Erfolg angewandt.

Ebenso wurde bei Organtransplantationen eine genügende Immunsuppression erreicht, obwohl dabei das eingebrachte Gewebe schaden erleidet und die Wundheilung verzögert wird. Cyclophosphamid wird aber bei diesen Arten von Erkrankungen wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen nur bei Versagen konventioneller Therapeutika verordnet.

2.3 Pharmakologie von Cyclophosphamid

2.3.1 Chemische Eigenschaften

Cyclophosphamid hat ein Molekulargewicht von 261,08. Es bildet mit 1 Mol H_2O ein Hydrat, das in Form von weißen, gut ausgebildeten Kristallen vorliegt. CLARDY, MOSBO und VERKADE (1972) zählten diese Kristallform dem triklinen System zu. Anhand einer Röntgenstrukturanalyse ermittelten sie die Molekülstruktur des Cyclophosphamids. Die Auswertung der Diagramme ergab eine äquatoriale Lage der Dialkylaminogruppe und eine axiale Anordnung des Phosphorylsauerstoffs, während der Sechsring in der Wannenform und nicht etwa in der Stuhlform vorliegt. Das exocyclische Stickstoffatom, das Phophor- und das Ringstickstoffatom liegen nahezu in einer Ebene. Folgendes Schema gibt in ungefähr die Molekülstruktur wieder:



Das Hydrat des Cyclophosphamids ist bei Zimmertemperatur lagerfähig und läßt sich in Wasser bis zu

einer Sättigung von 4 % lösen. Es ist ebenfalls gut löslich in Alkohol, Benzol, Chloroform, Dioxan und Glycol, weniger löslich in Äther und Aceton. Der pH-Wert einer 1 %igen wässrigen Lösung liegt bei 4,5. Die Halbwertszeit der Chlorionenfreisetzung als Zeichen der chemischen Aggressivität wurde durch Chlorionentitration mit über 7 Tagen angegeben. Zum Vergleich sei hier das Stickstofflost angeführt, dessen Halbwertszeit bei 15 min liegt. Dieses ist einer der Gründe dafür, daß Cyclophosphamid eine an und für sich inerte Substanz darstellt.

2.3.2 Pharmakokinetik beim Säuger

Über die Pharmakokinetik von Cyclophosphamid wurden erwähnenswerte Arbeiten bei Maus, Ratte, Kaninchen, Hund und bei anbehandelten Personen durchgeführt. Die Autoren beschäftigten sich in der Hauptsache mit der Resorption, der Abbaugeschwindigkeit und der Elimination von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten. Die Besonderheit von Cyclophosphamid liegt in der Vielzahl seiner Metaboliten. Einige Autoren unterscheiden in ihren Untersuchungen lediglich zwischen inaktive und aktive, d. h. alkylierende Substanzen.

2.3.2.1 Resorption und Ausscheidung

Die ersten grundlegenden Untersuchungen wurden vom wissenschaftlichen Stab der ASTA-Werke, Bielefeld, durchgeführt. BROCK und HOHORST berichteten 1963, daß sich kurze Zeit nach Applikation von Cyclophosphamid an Maus, Ratte und Meerschweinchen sowie an Kaninchen, Katze, Hund und Mensch das Auftreten zytostatischer Aktivität im Blutserum und in geringerem Umfange auch in verschiedenen blutfreien

Organextrakten nachweisen läßt. Das Aktivierungsprodukt wird in Urin und Galle stark angereichert ausgeschieden. Genauere Untersuchungen an Ratten zeigten, daß bereits nach 15 Minuten das Maximum an alkylierender Aktivität im Blutserum der Ratte erreicht ist und über 1-2 Stunden praktisch konstant bleibt. Den Ratten waren Dosen von 10-1000 mg/kg intraperitoneal verabreicht worden. Die Aktivität der Abbauprodukte war erst nach 4 Stunden auf ca. 50 % des Maximalwertes abgesunken. Nach 24 Stunden ließen sich keine aktiven Substanzen mehr nachweisen.

GRAUL (1969) fand bei autoradiographischen Untersuchungen mit tritiummarkiertem Cyclophosphamid bei der Ratte, daß bereits 30 Minuten nach intravenöser Injektion fast alle Gewebe außer Gehirn und Knochensubstanz eine deutliche Radioaktivitätsanreicherung gegenüber dem Blut aufwiesen. Am stärksten war die Anreicherung über Leber, Niere, Knochenmark, Lymphgefäße und Lymphknoten, Lunge und Thymus ausgeprägt. Die biologische Halbwertszeit von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten wurde mit ca. 20 Stunden, die Halbwertszeit für die Metabolisierung mit etwa 1 Stunde angegeben.

GERHARDS und GRAUL veröffentlichten 1970 eine Arbeit mit ähnlichen Ergebnissen. Sie errechneten für die Ratte eine Metabolisations-Halbwertszeit von 1,3 Stunden.

MELLET (1963) untersuchte mit tritiummarkiertem Cyclophosphamid bei Hunden. Nach intravenöser Injektion von 1 mg/kg zeigte das Plasma nach 5 Minuten eine Aktivität entsprechend einer Cyclophosphamidmenge von 2,2 µg/ml. Nach 6 Stunden waren noch

0,2 µg/ml nachweisbar. Im Urin wurden ca. 11-14 % des unveränderten Cyclophosphamids ausgeschieden. Die Gesamtradioaktivität des 24-Stunden-Urins betrug etwa 43 % der insgesamt verabreichten Menge. Nach oraler Applikation von 1 mg/kg erreichten die maximalen Plasmawerte nach einer Stunde nur den Spiegel von 0,2-0,4 µg/ml. Im Urin waren nur 4-6 % unverändertes Cyclophosphamid aufzufinden. Die Gesamtradioaktivität betrug hier 15-23 %. Im Stuhl wurden 17-31 % unverändertes Cyclophosphamid wiedergefunden. Die Gesamtradioaktivität lag hier bei 31-66 %. Gewebeuntersuchungen zeigten eine Aktivitätsanreicherung in Nieren, Leber, Milz und Galle.

KLINKE, LISS und PALME (1964) verabreichten Kaninchen tritiummarkiertes Cyclophosphamid in einer Dosis von 50-100 mg/kg. Zu verschiedenen Zeiten danach wurden Blutproben entnommen sowie Galle und Harn über einen Zeitraum von mehreren Stunden gesammelt. Durch Aktivitätsmessung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten konnte der zeitliche Verlauf in den Körperflüssigkeiten verfolgt werden. Die Cyclophosphamidkonzentration fiel im Serum in den ersten Minuten nach intravenöser Injektion rasch ab. Nach 10 Minuten waren nur noch 5 % der injizierten Substanz im Blutplasma vorhanden. Sie vermuteten, daß es direkt nach der Injektion zu einem starken Einstrom von Cyclophosphamid in die Gewebe kommt. Die Menge an Umwandlungsprodukten war zu dieser Zeit gering (ca. 5 % des injizierten Cyclophosphamids). Danach erfolgte allmählich ein Rückstrom von Cyclophosphamid aus dem Gewebe ins Blut. In der Galle fand sich schon bald eine wesentlich höhere Konzentration an Cyclophosphamid und seinen Metaboliten als im Serum. Die Konzentration der Umwandlungsprodukte im Serum fiel langsam ab. Nach 6 Stunden waren ca. 40 % der injizierten Cyclophosphamidmenge ausgeschieden.

KLINKE (1969) untersuchte die Umwandlung und die Ausscheidung von Cyclophosphamid beim Kaninchen. Die Untersuchungen wurden nach intravenös applizierten Dosen von 50-100 mg/kg tritiummarkiertes Cyclophosphamid durchgeführt. Nach 10 Minuten wurden ca. 11 % der applizierten Menge im Blutplasma wiedergefunden. Nach 6 Stunden waren fast 50 % der injizierten Menge an Cyclophosphamid ausgeschieden. Der Autor wies darauf hin, daß das Verhältnis der Konzentrationen von Cyclophosphamid zu seinen Metaboliten im Blut bei Ratte und Kaninchen unterschiedlich ist.

BORIES, RENERRE und ROUGEOT (1970) gaben Angora Kaninchen P^{32}-markiertes Cyclophosphamid in einer oralen Dosis von 70 mg/kg. 68,7 % der Radioaktivität wurden im Urin und 27,8 % im Stuhl ausgeschieden. Die Studie lief über 14 Tage. Bis zum 15. Tag waren 96,5 % der Radioaktivität eliminiert.

BOLT, RITZL und NAHRMANN (1963) untersuchten als eine der ersten das pharmakokinetische Verhalten von Cyclophosphamid beim Menschen. Sie gaben Patienten mit inoperablen Tumoren eine Dosis von 200 mg/Person tritiummarkiertes Cyclophosphamid. 90 Minuten nach intravenöser Injektion traten im Harn und im Serum verschiedene radioaktive Substanzen auf. Die Ausscheidung erfolgte zum Teil als unverändertes Cyclophosphamid. Nach 3 Tagen waren ca. 70 % der Radioaktivität ausgeschieden.

RÖTTGER (1970) wies bei intravenöser Applikation von Cyclophosphamid beim Menschen zwei Konzentrationsgipfel nach. Der erste von ca. 1 1/2 Stunden wird durch die rasche Metabolisierung und dem Abstrom in die Gewebe erklärt (Verteilungsphase). Der zweite Gipfel, der nach 4-6 Stunden auftritt, sei bedingt

durch den Rückstrom von Cyclophosphamid aus den Geweben (Ausscheidungsphase). Bei der oralen Therapie wird dieses Bild durch die langsamere intestinale Resorption verwischt.

COHEN, JAO und JUSKO beschrieben 1971 Untersuchungen an 7 Männern mit malignen Tumoren, aber uneingeschränkter Leber- und Nierenfunktion. Die Patienten erhielten Dosen von 200-1000 mg C^{14}-markiertes Cyclophosphamid intravenös. Der Konzentrationsverlauf von unverändertem Cyclophosphamid ergab eine biexponentielle Abnahme mit rascher Verteilungs- und nachfolgender Ausscheidungsphase. Die Halbwertszeit belief sich auf 3-11 Stunden. Eine ausgeprägte tubuläre Rückresorption von unverändertem Cyclophosphamid bewirkte eine niedrige Nieren-Clearence von 10,7 ml/min. Im Stuhl wurden praktisch keine meßbaren Mengen unverändertes Cyclophosphamid gefunden. Durchschnittlich 88 % der injizierten Dosis wurden metabolisiert. Die Autoren folgerten, daß die Metabolisierung beim Menschen nur wenig dosisabhängig und limitiert ist.

GAERTNER (1971) verglich die Pharmakokinetik beim Menschen und beim Kaninchen. Die injizierte Dosis lag zwischen 25 und 50 mg/kg. Die höchste Konzentration von unverändertem Cyclophosphamid im Blut stellte sich bei Mensch und Tier nach 8 Minuten ein. Die Halbwertszeit von Cyclophosphamid betrug beim Kaninchen 40 Minuten, beim Menschen 4 Stunden und 45 Minuten. Nach 4 Stunden beim Versuchstier und nach 20 Stunden beim Menschen war die Nachweisbarkeitsgrenze erreicht. Die Ausscheidung erfolgte bei Beiden zu 70 % als aktive Produkte und zu 30 % als wahrscheinlich unverändertes Cyclophosphamid. Beim Menschen waren nach 10 Stunden erst 20 % der injizierten Menge, beim Kaninchen nach 6 Stunden ca. 70 % der Gesamtmenge ausgeschieden.

DOLD und GAERTNER (1972) beschrieben bei Mensch und Kaninchen vergleichbare Ergebnisse. Die höchsten Konzentrationen zytostatisch aktiver Substanzen wurden beim Kaninchen ca. 30 Minuten nach Cyclophosphamid-Applikation, beim Menschen nach 2-4 Stunden erreicht. Das Verhältnis zwischen den Konzentrationen unveränderten Cyclophosphamids und alkylierender aktiver Substanzen im Serum betrug beim Kaninchen 3:1, beim Menschen 11:1. Aus den Befunden wurde geschlossen, daß die metabolische Umwandlung von Cyclophosphamid beim Menschen und beim Kaninchen unterschiedlich schnell abläuft. Bei Gabe hoher Dosen werden beim Menschen im Gegensatz zum Kaninchen im Serum keine proportionalen Konzentrationen aktiver Substanzen gefunden. Die Folge eines beim Menschen erreichten Sättigungsgrades der Cyclophosphamidaktivierung ist die Limitierung zytostatisch aktiver Substanzen im Blut. Nach Angaben der Autoren ist Cyclophosphamid als das"Zytostatikum mit automatischer Notbremse"anzusehen.

2.3.2.2 Metabolismus

ARNOLD und BOURSEAUX (1958) synthetisierten verschiedene Cyclophosphamide, die als Transportform inaktiv, jedoch im neoplastischen Gewebe durch Hydrolyse aktiv seien. In den ersten Untersuchungen über die Aktivierung des Cyclophosphamids erkannte man aber, daß die Hydrolyse nicht durch die Phosphatasen und Phosphamidasen, die besonders im Krebsgewebe gehäuft vorkommen, eingeleitet wird.

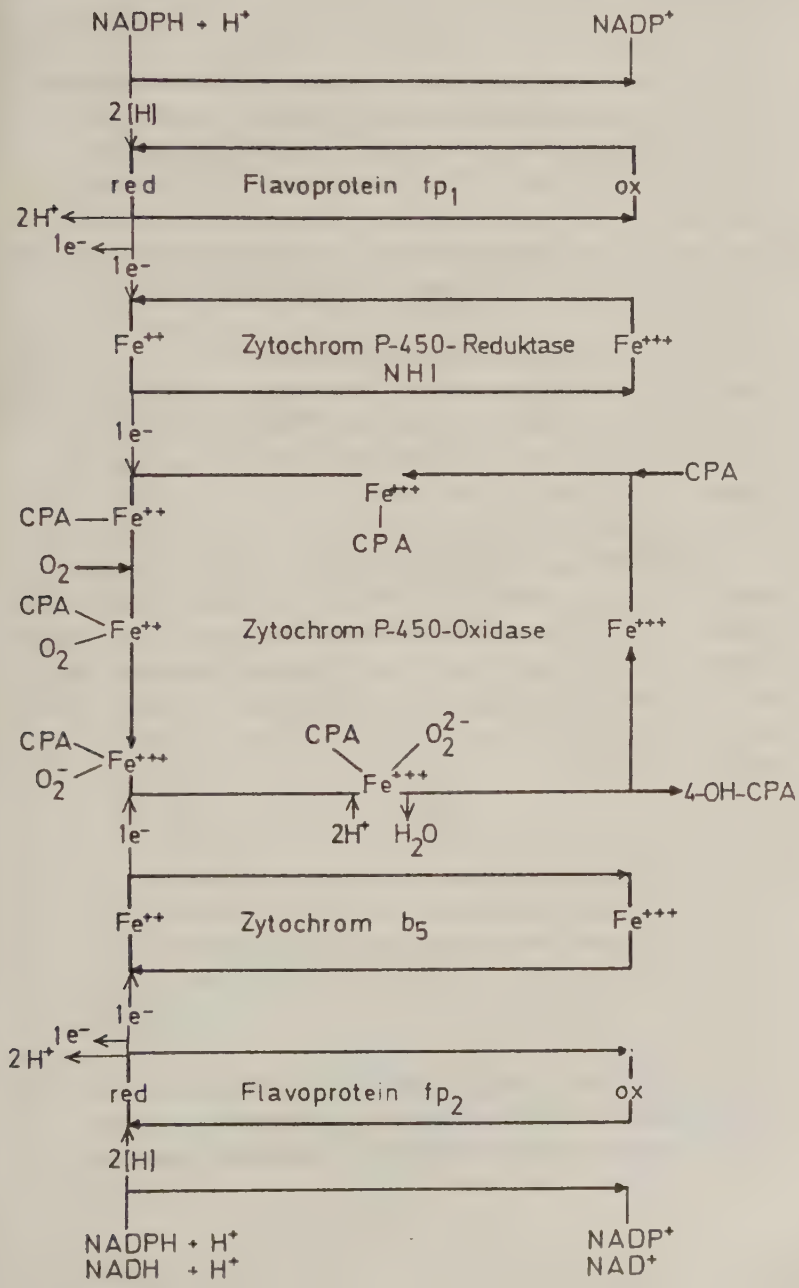
BROCK und HOHORST (1963) zeigten durch Zellfraktionierungsversuche, daß Leberschnitte und in weit geringerem Maße auch Schnitte von Nierenrinde und Lungengewebe während der Inkubation bei 37°C eine starke Aktivierung von Cyclophosphamid einleiteten. Dagegen

konnten gereinigte Phosphatasen und Phosphamidasen, wie etwa die saure Prostataphosphatase und die alkalische Nierenphosphatase sowie die Phosphamidase der Rindermilz, Cyclophosphamid nicht aktivieren. Weiterhin stellten die Autoren fest, daß diese Aktivierung durch ein mikrosomales Enzymsystem der Leber unter Verbrauch von Sauerstoff und reduziertem $NADPH_2$ erfolgt und daß dieser Vorgang als mischfunktionelle Oxydation aufzufassen ist.

Zu den Schlüsselenzymen dieser Oxydation gehören die $NADPH_2$-Zytochrom-c-Reduktase, ein Flavinenzym, das die Oxydation von $NADPH_2$ katalysiert, die Zytochrom-P-450-Oxidase und ein Enzym, das Zytochrom-P-450-Oxidase reduziert. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Zytochrom-P-450-Oxidase (siehe Abbildung 3). In seiner oxidierten Form bindet es das zu oxidierende Substrat, hier das Cyclophosphamid, und wird selbst reduziert. Unter Aufnahme von 2 Protonen entsteht dann H_2O und nach Aufnahme des im Komplex aktivierten Sauerstoffs das oxidierte Substrat, hier das 4-Hydroxy-Cyclophosphamid. Es ist fraglich, ob 4-Hydroxy-Cyclophosphamid in der Leberzelle weiter metabolisiert werden muß oder in den Blutkreislauf gelangt und dann weiter abgebaut wird. Im Blut steht das 4-Hydroxy-Cyclophosphamid in einer Gleichgewichtsreaktion mit dem ringoffenen Aldophosphamid.

VOELKER, DRAEGER, PETER und HOHORST (1974) ermittelten in einer Studie zum Spontanzerfall von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid den Tautomeriekoeffizienten von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid zu Aldophosphamid (K (4-OH)/(ALDO) = 1,69).

Abbildung 3 : MISCHFUNKTIONELLE OXYDATION VON CYCLOPHOSPHAMID



HILL, LASTER und STRUCK (1971) glaubten, daß der antitumorale Effekt von Cyclophosphamid dem Aldophosphamid zuzuschreiben sei.

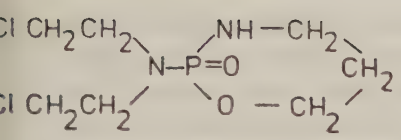
Der weitere Abbau von Cyclophosphamid ist vornehmlich durch die drei Autorengruppen CONNORS, COX, FARMER, FOSTER und JARMAN (1973), HILL, LASTER und STRUCK (1971) sowie SLADEK (1973) untersucht worden. Durch fortschreitende Hydrolyse des Aldophosphamids entstehen N,N-bis(ß,ß'chlorethyl)-Phosphorsäurediamid (Friedmansäure) und Acrolein (Abbildung 4).

ALARCON und MEIENHOFER (1971) publizierten eine Arbeit über das beim Cyclophosphamidabbau entstehende Acrolein, in der sie die Ansicht äußerten, daß das stark zytotoxische und reaktionsfähige Aldehyd für die tumorhemmende Wirkung entscheidend ist.

Die Aldehyddehydrogenase entlastet den Ablauf der Reaktionskette. Einerseits bildet sie aus dem anfallenden 4-Hydroxy-Cyclophosphamid das 4-Keto-Cyclophosphamid, andererseits aus dem Aldophosphamid das wenig aktive Carboxyphosphamid. Diese beiden Produkte werden nicht weiter umgesetzt; sie sind im Serum und Urin nachweisbar.

BACK, BARDOS, CHMIELEWICZ, ACHTER und MUNSON (1965) stellten zur Diskussion, ob die Friedmansäure zu den entgültigen antitumoral aktiven Substanzen der alkylierfähigen Äthylenimonia weiter metabolisiert werde oder bereits selbst den zytostatischen Angriff ausführt.

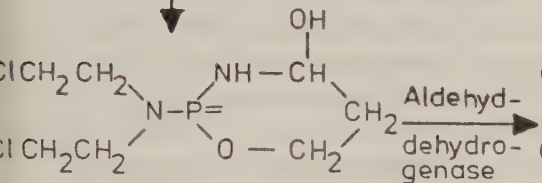
Die Schnelligkeit des Abbaus von Cyclophosphamid ist abhängig von dem mikrosomalen Enzymsystem, in der die Zytochrom-P-450-Oxidase die zentrale Stellung



Cyclophosphamid

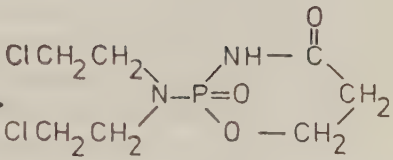
Abbildung 4 : METABOLISATION VON CYCLOPHOSPHAMID

Zytochrom P 450 Oxidase

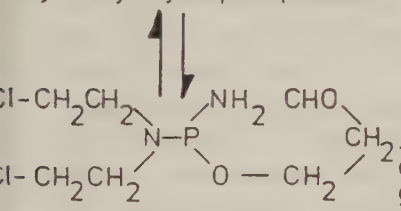


-Hydroxy-Cyclophosphamid

Aldehyd-dehydrogenase

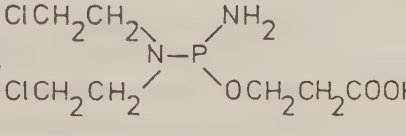


4-Keto-Cyclophosphamid

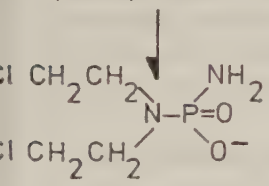


Aldophosphamid

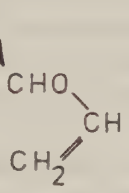
Aldehyd-dehydrogenase



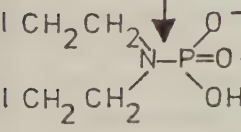
Carboxyphosphamid



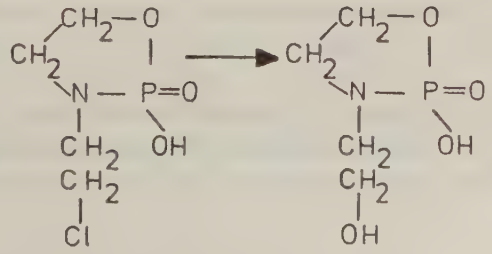
Friedmansäure



Acrolein



esaminierte riedmansäure



alkylierfähiges

einnimmt. Für jede Tierspezies gibt es unterschiedliche Werte bezüglich der Abbaurate. Die Werte werden durch die Michaelis-Menten-Konstante K_m wiedergegeben und betragen für die Maus 0,5 mM (HILL, LASTER und STRUCK, 1971) und für die Ratte 1,39 mM (SLADEK, 1973). Dieses Enzymsystem kann durch Vorbehandlung mit einigen Pharmaka wie Phenobarbital und Imipramin stimuliert werden (BROCK und HOHORST 1963). Durch Vorbehandlung mit Kobaltchlorid oder SKF 525 A (α,α'-diphenyl-α-propyl-essigsäure-ß-diäthyl-aminoäthylester) kann dieses Enzymsystem gehemmt werden. Die Förderung oder Hemmung der Aktivierung ist nicht gleichbedeutend mit einer Steigerung oder Verminderung der antitumoralen Wirksamkeit.

2.4 Toxikologie von Cyclophosphamid

2.4.1 Kanzerogenität und Mutagenität von Cyclophosphamid

Agentien, die am genetischen Material angreifen, können kanzerogene Effekte hervorrufen. Dies gilt auch für Zytostatika. Beim Menschen wurden nach Anwendung von Zytostatika Zweittumoren beobachtet, ohne daß dabei die Zusammenhangsfrage geklärt werden konnte.

Auch mutagene Effekte sind als Folge einer zytostatischen Therapie möglich. Mit Cyclophosphamid wurden viele Untersuchungen zur Mutagenese durchgeführt. Cyclophosphamid greift vermutlich wie auch andere alkylierende Zytostatika in der G_2- bzw. in der S-Phase des Zellzyklus ein.

SCHMIDT, ARAKAKI, BRESLAU und CULBERTSON (1970) zeigten am Knochenmark- und Fibroplastenmaterial von Chinesischen Hamstern, daß Cyclophosphamid Chromoso-

menbrüche hervorruft. Mit steigender Dosis nahm die Häufigkeit an Chromosomenaberrationen stetig zu bis zur kompletten Pulverisation. Dabei ergab eine zweimalige Anwendung mit 24-Stunden-Intervall einen achtmal höheren Effekt als eine einmalige Applikation. Weitere Gaben über mehrere Tage ließen einen relativen Rückgang an Chromosomenschäden erkennen.

KLINKE, LISS und PALME (1964) unternahmen autoradiographische Untersuchungen an Tumorzellen von Mäusen. Sie stellten fest, daß weniger als 1 von 100 000 DNS-Nukleotiden alkyliert wird. Danach halten sie es für unwahrscheinlich, daß diese Alkylierung für die Hemmung der DNS-Synthese ursächlich ist. Ihre Vermutung geht dahin, daß der Angriff des Cyclophosphamids auf die entsprechenden Synthese-Fermente die eigentliche Wirkung darstellt.

LISS, SCHMIDT, SCHAUMLÖFFEL und PALME (1973) bekräftigten diese These und diskutierten andere Angriffsmöglichkeiten des Cyclophosphamids. Sie glaubten, daß die eigentliche Ursache in der Hemmung des im Anschluß an die DNS-Synthese stattfindenden Umbauprozesses des Chromatins läge, womit die Erzeugung eines prämitotischen Blocks geschaffen würde.

DATTA und SCHLEIERMACHER (1969) kamen nach Untersuchungen am Knochenmark von Chinesischen Hamstern mit der Dosis von 200 mg/kg zu dem Schluß, daß durch Cyclophosphamid induzierte, makroskopisch sichtbare Abweichungen in diesen Geweben keine signifikante genetische Gefahr darstellen. Dagegen seien Punktmutationen und unentdeckte kleine Deletionen ein größeres genetisches Risiko.

VOGEL und JÄGER (1969) führten eine erbbiologische Untersuchung an 663 Zytostatikapatienten durch, um das Risiko der mutagenen Wirkung von Zytostatika auf eine menschliche Population zu erfassen. Das Ergebnis zeigte, daß die Fortpflanzung dieser Patienten weit unterhalb der altersspezifischen Höhe lag. Diese Reduktion war teilweise durch soziologisch-psychologische Einflüsse, teils durch biologische Faktoren verursacht. So kam es, daß innerhalb dieses Kollektivs nur insgesamt 6 Kinder nach Beginn der zytostatischen Therapie empfangen wurden. In 2 dieser Fälle war ein Elternteil mit Cyclophosphamid behandelt worden. Bei keinem der untersuchten Kinder dieser Patienten zeigte sich ein genetischer Defekt. Das genetische Risiko wurde von den Autoren zwar als gering, aber nicht vernachlässigenswert erachtet.

RÖHRBORN und VOGEL (1967) testeten verschiedene chemische Substanzen hinsichtlich ihrer mutagenen Wirkung bei der Maus. Als Maß hierfür diente die Zahl der dominanten Letalmutationen, die anhand der präimplantativen und postimplantativen Eiverluste erfaßt wurden. Cyclophosphamid wurde in einer Dosis von 60 bzw. 210 mg/kg intraperitoneal appliziert. In den Keimzellen der männlichen Tiere kam es zu einem signifikant vermehrten Auftreten dominanter Letalfaktoren, also zu einem mutagenen Effekt. Nach einer Dosis von 420 mg/kg Cyclophosphamid zeigten alle getesteten Männchen Sterilität.

Diese und frühere Ergebnisse veranlaßten RÖHRBORN (1965) zu der Forderung, daß männliche und weibliche Patienten im zeugungsfähigen Alter während der Chemotherapie und für etwa 3 Monate danach zu kontrazeptiven Maßnahmen bzw. zur Abstinenz geraten werden sollte.

2.4.2 Embryotoxizität von Cyclophosphamid

Mit Cyclophosphamid liegt ein Pharmakon vor, über das zahlreiche embryotoxische Untersuchungen auch in Zusammenhang mit seinen metabolischen Umbauprodukten publiziert worden sind. Dabei sind unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Embryotoxizität erarbeitet worden.

2.4.2.1 Beim Hühnchen

Obwohl der Hühnchenembryo ein beliebtes Versuchstier in der Teratologie darstellt, muß man die gefundenen Ergebnisse in ihrer Bedeutung für den Menschen vorsichtig abwägen und mit Untersuchungen an Säugern vergleichen. Diffusions- und Löslichkeitsprobleme spielen eine Rolle, ferner der fortdauernde Verbleib der Substanz und seiner möglichen Abbauprodukte. Die ersten Untersuchungen zur Embryotoxizität von Cyclophosphamid überhaupt wurden an Hühnchenkeimen angestellt.

GERLINGER, RUCH, COURRIER und CLAVERT (1962) gaben in einer vorläufigen Mitteilung Bericht über die Wirkung von Cyclophosphamid auf die Entwicklung des Hühnchenembryos. Bei einer Dosis von 0,1 mg/Ei Cyclophosphamid in 0,2 ml Tyrode-Lösung, am Tage 0 in den Dottersack injiziert, waren am 11. Tag 60 % der Embryonen abgestorben. Von den Lebenden zeigten 34 % Mißbildungen in Form von Hypotrophie, Brachymelie aller Extremitäten sowie Papageienschnabelbildung, fehlenden Augenlidern und Herzdefekten. Eine zweite Serie, am 14. Tag eröffnet und untersucht, erbrachte eine Mortalitätsrate von 77 %. Dabei war hier die Häufigkeit von mißgebildeten Feten mit 20 % günstiger als in der ersten Serie.

Die mit Cyclophosphamid behandelten Hühnchenkeime waren im Vergleich zu einer Kontrollserie im Gewicht reduziert.

KARNOFSKY und LACON veröffentlichten 1962 eine Untersuchung über teratogene Effekte von mehreren Zytostatika an Hühnchenembryonen. Die Testsubstanzen wurden sowohl nach einem Verfahren von KARNOFSKY in den Dottersack der 4 Tage alten Hühnchenembryonen als auch am 8. Tag in die Chorioallantoismembran injiziert. In der Serie mit Cyclophosphamid als Testsubstanz gab es nur gelegentlich Mißbildungen. Beschrieben wurden Papageienschnabelbildung, Mikromelie, Augenzysten und Hemmung der Gefiederbildung.

GERLINGER und RUCH (1964) veröffentlichten im Anschluß an frühere Arbeiten Herzmißbildungen nach Cyclophosphamidinjektionen bei Hühnchenembryonen. Bei den mit 0,1 mg/Ei behandelten Hühnchenkeimen zeigten von 31 mißgebildeten 14, von 15 anomalen 6 und von 27 anscheinend normalen Embryonen 10 Herzmißbildungen. Die Mißbildungen des Herzens betrafen vorwiegend den Bereich der Scheidewände von Bulbus und Ventrikel.

SINGH, TULI und GUPTA (1971) gaben in ihren Untersuchungen beim Hühnchen ein differenziertes Bild über teratogen wirksame Dosen in Bezug auf die zeitlichen Abläufe der Embryonalentwicklung. Cyclophosphamid wurde in Dosen von 0,005, 0,01 und 0,02 mg/Ei an den Tagen 1-6 nach Beginn der Bebrütung in den Dottersack appliziert. Ferner wurde an den Tagen 4 und 5 die Dosen von 0,035-0,08 mg/Ei getestet. Die Eier wurden am 19. oder 20. Tag eröffnet und folgende Mißbildungen festgestellt: Schädel-, Schnabel- und Wirbelsäulendeformitäten sowie Mißbildungen der Glieder und der Zehen, der Augen, ferner eine Ectopia viscerum und

eine Wachstumshemmung. Am stärksten embryotoxisch erwiesen sich die Dosen von 0,04 und 0,05 mg/Ei am 5. Tag. Die Höchstdosis von 0,08 mg war am Tag 5 für eine große Zahl der Hühnchenembryonen letal. Die aufgetretenen Mißbildungen zeigten nach Meinung der Autoren auffallende Ähnlichkeit mit Mißbildungen, die durch Cyclophosphamid bei Ratten und Mäusen induziert wurden. Beim Hühnchenkeim zeigten jedoch weit geringere Dosen von Cyclophosphamid embryotoxische Wirkungen.

2.4.2.2 Bei der Maus

SHOJI und OHZU beschrieben 1965, daß bei dem getesteten Mäusestamm DM/MK eine Dosis von 25 mg/kg Cyclophosphamid nicht embryotoxisch sei. Erst bei Dosen über 50 mg/kg gaben die Autoren an, Anomalien nachweisen zu können.

GIBSON und BECKER (1968a) beschrieben in ihren Untersuchungen zur Embryotoxizität von Cyclophosphamid bei der Swiss-Webster-Maus nicht nur Mißbildungen, sondern stellten auch Häufigkeitsgipfel für bestimmte Anomalien auf. Die Swiss-Webster-Mäuse wurden zu verschiedenen Zeiten der Gestation (9.-14. Tag) intraperitoneal mit 20 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Makroskopisch waren Gaumenspalten (Maximum 9. Tag), Exencephalien, Fingerdefekte und Spaltschwanzbildungen zu beobachten. Die Skelettanomalien bestanden in Polydaktylien (Maximum 9. Tag), Syndaktylien (Maximum 10. Tag), Ektrodaktylien (Maximum 11. Tag), Adaktylien (Maximum 11. bis 12. Tag) sowie Verschmelzung und Verkrümmung langer Röhrenknochen und Fehlen von Rippen. Zu den Weichteilmißbildungen zählten offene Augen (Maximum 9. bis 10. Tag), Aphakien (Maximum 9. bis 11. Tag), Mikrophagie (Maximum 12. Tag) sowie Hydro-

Resorptionen vor. Eine Dosis von 5-10 mg/kg verursachte eine höhere Resorptionsrate und eine abnehmende Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle, aber keine Zunahme an Mißbildungen.

Cytoxylalkohol 280 mg/kg, Cytoxylamin über 270 mg/kg, Phosphamid-Lost 154 mg/kg, Nor-Stickstofflost 40 mg/kg, Stickstofflost 1,6 mg/kg. Alle diese Substanzen waren für den mütterlichen Organismus toxisch. Die Mißbildungen waren von Substanz zu Substanz verschieden und wiesen keine Parallelen zu denen des Cyclophosphamids auf. Cytoxylalkohol setzte Gaumenspalten, Hydronephrosen und Fingerdefekte; lediglich Phosphamid-Lost und Stickstofflost beeinflußten die Skelettentwicklung. Cytoxylamin und Stickstofflost zeigten am 10. Tag schwach teratogene Wirkung; allein Stickstofflost wirkte am 14. Tag teratogen. Durch Messungen der alkylierenden Aktivität mit Hilfe des NBP-Testes konnten keine Korrelationen zwischen embryotoxischem Effekt und alkylierenden Eigenschaften der Substanzen gefunden werden. Die Teratogenität von Cyclophosphamid konnte keinem der möglichen Metaboliten zugeschrieben werden.

GEBHARDT (1970) untersuchte, ob Cyclophosphamid einen letalen Effekt auf Mäuseembryonen ausübt, die jünger als 9 Tage sind, und ob eine von GIBSON und BECKER beschriebene biphasische Mortalitätskurve bestätigt werden kann. Den graviden Swiss-Mäusen wurde an

verschiedenen Tagen 10 oder 20 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal verabreicht. Bei mehr als 3 Resorptionen bei einem Muttertier wurde von einem embryoletalen Effekt gesprochen. Ein erstes Maximum an Embryoletalität fand sich am 3. Tag, ein zweites am 8. und 9. Tag der Gestation.

GEBHARDT (1971) verglich nach Verabreichung von 15 mg/kg Cyclophosphamid die Häufigkeit von Gaumenspalten mit der Häufigkeit an Oligodaktylien bei der Maus. Am 12. Tag der Gestation war das Verhältnis Gaumenspalten zu Oligodaktylien wie 84 zu 26. Die größte Häufigkeit an Oligodaktylien ergab sich nach Injektion am 9. Tag: 100 % gegenüber 34 % an Gaumenspalten. Nach Verminderung der Dosis auf 10 mg/kg reduzierte sich die Häufigkeit an Oligodaktylien auf 59 % und die der Gaumenspalten auf 18 %.

GIBSON und BECKER (1971) prüften, ob eine Vorbehandlung der mütterlichen Leber mit Phenobarbital oder SKF 525 A die Placentapassage von Cyclophosphamid beeinflußt. Den Swiss-Webster-Mäusen wurden intraperitoneal 20 mg/kg C^{14}-markiertes Cyclophosphamid zugeführt. Im Uterus fand sich nach 2-8 Minuten eine hohe Radioaktivität. In der Placenta und im Embryo trat am 10. Tag der Gestation nach 2 Minuten Radioaktivität auf. Die Radioaktivität im Embryo war zu allen Zeiten geringer als in anderen Geweben. Das Maximum war hier nach 16 Minuten erreicht. Bei Vorbehandlung mit SKF 525-A war nach 32 und 128 Minuten der Anteil an unverändertem Cyclophosphamid in Plasma, Urin, Amnionflüssigkeit und Embryo vermehrt, bei Vorbehandlung mit Phenobarbital war dieser Anteil im Urin signifikant verringert, in den übrigen Geweben kaum verändert.In anderen Untersuchungen war

bei Vorbehandlung mit SKF 525 A eine signifikante Erhöhung der Embryotoxizität von Cyclophosphamid festgestellt wurde. Bei Vorbehandlung mit Phenobarbital hingegen verringerte sich der embryotoxische Effekt signifikant, obwohl die alkylierende Aktivität zunahm. Daraus schlossen die Autoren, daß die Plazenta von unverändertem Cyclophosphamid besser passiert wird als von seinen Metaboliten. Die embryotoxische Wirkung beruht nach Meinung der Untersucher eher auf unverändertem Cyclophosphamid, das möglicherweise im Embryo zu teratogenen Substanzen enzymatisch abgebaut wird.

MURTHY, BECKER und STEELE (1973) versuchten die Frage zu klären, ob die embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid auf einer Alkylierung von makromolekularen Strukturen des Embryos gravider Swiss-Webster-Mäuse beruht. Am 10. Tag der Gestation wurde den Muttertieren 10 und 20 mg/kg tritiummarkiertes Cyclophosphamid intraperitoneal verabreicht. Ein Teil der Tiere wurde zusätzlich mit SKF 525 A oder mit Phenobarbital vorbehandelt. Es zeigte sich, daß Cyclophosphamid und/oder seine Metaboliten fest an DNS, RNS und an Proteine des Embryos gebunden wird. Das Ausmaß der DNS-Bindung nahm bei Dosiserhöhung von 10 auf 20 mg/kg um das Vierfache zu, während die Bindung an die RNS und die Proteine nur verdoppelt wurde. Phenobarbital-Vorbehandlung verminderte die DNS-Bindung, SKF 525 A zeigte keine Veränderungen der embryonalen DNS-Bindung. Das Ausmaß der Bindung an die RNS und die Proteine des Embryos zeigte keine Korrelation zur Häufigkeit von Fehlbildungen. Dahingegen wies die DNS-Bindung im Embryo eine positive Korrelation zur Häufigkeit der durch Cyclophosphamid hervorgerufenen Mißbildungen auf. Diese Ergebnisse bestärk-

ten die Autoren in ihrer Annahme, daß Cyclophosphamid und/oder seine Metabolite über eine Alkylierung der embryonalen DNS die embryotoxische Wirkung ausübt.

2.4.2.3 Bei der Ratte

KRAHE (1962) berichtete über Untersuchungen mit verschiedenen Zytostatika vor und während der Gestation bei Ratten. Nach Anwendung von Cyclophosphamid in Dosen, die den therapeutischen Gaben beim Menschen entsprechen, wurden weder in der ersten noch in der zweiten Schwangerschaftshälfte bei den neugeborenen Ratten Mißbildungen beobachtet. Die Wurfgrößen waren jedoch gegenüber den Kontrollen vermindert. Einige Muttertiere wurden für 6 Wochen steril. Bei einer täglichen Gabe von Cyclophosphamid über vier Wochen vor der Konzeption ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich Wurfgröße und Mißbildungsrate zur Kontrolle. Nach Applikation der DL_{50} (160 mg/kg) während der Gestation wurden keine lebenden Jungtiere geboren.

v. KREYBIG (1965) untersuchte Extremitätenmißbildungen bei der Ratte nach einmaliger Gabe von 5-40 mg/kg Cyclophosphamid. Die Injektion erfolgte intraperitoneal vom 11. bis zum 15. Tag der Gestation. Nach Applikation vom 12. bis 14. Tag kam es vor allem zu Veränderungen der distalen Extremitäten. Es traten Polydaktylien, Oligodaktylien, Ektrodaktylien, Hexadaktylien und Defekte des Radius und der Fibula auf. Am 15. Tag nahm die Empfindlichkeit der Extremitäten auf embryotoxische Dosen von Cyclophosphamid ab.

v. KREYBIG publizierte 1966 eine Arbeit über die Phasenspezifität und die organotrope Wirkung von

Cyclophosphamid bei der Ratte. Am 13. Tag der Gestation wurde eine kombinierte Behandlung mit 10 mg/kg Cyclophosphamid und 10 mg/kg N-methyl-N-Nitrosoharnstoff durchgeführt. Das teratologische Ergebnis zeigte eine Kombination der für beide Substanzen typischen Mißbildungsformen.

HACKENBERGER und v. KREYBIG (1965) veröffentlichten vergleichende Untersuchungen zur Teratogenese bei Maus und Ratte. Sie fanden, daß die Aufeinanderfolge der kritischen Phasen der vorderen und hinteren Extremitäten, wie sie bei der Ratte auftreten, bei Anwendung von Cyclophosphamid bei der Maus ausblieben, da diese eine kürzere Embryogenese besitzt und die entsprechenden kritischen Phasen näher zusammenliegen. Bei der Maus zeigte sich im Mißbildungsspektrum der kranialen Region eine geringere Empfindlichkeit als bei der Ratte. Fehlbildungen im Bereich der Wirbelsäule traten bei der Maus dagegen häufiger auf als bei der Ratte. Auf die Bedeutung entwicklungsphysiologischer Kenntnisse über verschiedene Tierarten wurde bei einem Vergleich bestimmter Mißbildungssyndrome aufmerksam gemacht.

v. KREYBIG und SCHMIDT (1966) führten 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 20 mg/kg Cyclophosphamid (11 % der DL_{50}) am 13. Tag der Gestation bei der Ratte histologische Untersuchungen durch. Sie beobachteten einen Mitosestop mit ausgedehnter Gewebsdestruktion und erheblicher Zunahme der embryonalen Abräumzellen. Ferner beschrieben sie in den geschädigten Geweben karyorrhektische Vorgänge und pyknotische Kerne. Trotz weiteren Wachstums der embryonalen Gewebe blieben im Nachhinein Gewebslücken und hypoplastisch fehlgebildete Organe. Besondere Bedeutung legten die Autoren auf die Gehirnentwicklung. Bei der Entstehung des Telencephalons und des gesamten Gehirn-Gefäßsystems beobachteten sie eine anomale Weiterentwicklung.

ANGEL (1965) fand bei Applikation von Cyclophosphamid in einer Dosis, die einer therapeutischen Dosis beim Menschen entspricht, an trächtigen Ratten eine Verminderung der Wurfgröße, herabgesetztes Gewicht der Jungtiere und Resorption aller Keimanlagen bei einigen Muttertieren, jedoch keine Mißbildungen. Bei Applikation von Cyclophosphamid 4 Wochen vor der Gestation war kein embryotoxischer Effekt nachweisbar. Mutagene Effekte blieben bis in die F_3-Generation nicht erkennbar.

CHAUBE, KURY und MURPHY (1967) gaben Wistar-Ratten vom 2.-19. Tag der Gestation Dosen von 2,5-40 mg/kg Cyclophosphamid. Die Dosis von 2,5 mg/kg blieb ohne jegliche Wirkung auf die Feten. Lediglich die Resorptionsrate der am 9. Tag der Gestation behandelten Tiere war auf 37 % erhöht. Bei 5 mg/kg war die Resorptionsrate am 5.-8. Tag gering, dagegen am 9. Tag stark erhöht. Die Untersucher erhielten ausschließlich Resorptionen bei einer Dosis von 7 mg/kg am 9. Tag, bei einer Dosis von 10 mg/kg am 8., 9. und 11. Tag, bei einer Dosis von 15 mg/kg am 12. Tag und bei einer Dosis von 40 mg/kg und mehr zwischen dem 3.-7. Tag. Alle überlebenden Feten, deren Mütter zwischen dem 2.-10. Tag eine Cyclophosphamid-Dosis erhalten hatten, waren normal. Nach Gabe von 7 mg/kg am 11. und 12. Tag kam es zu 20-35 % mißgebildete Feten. Nach Gabe von 10 mg/kg am 12. Tag zeigten alle Feten Mißbildungen. Die wichtigsten Mißbildungen wurden im ZNS, an den Extremitäten, am Schwanz und am Gaumen beobachtet.

SINGH (1971) gab in einer ersten Serie an den Gestationstagen 8 und 9 Wistar-Ratten 3-5 mg/kg Cyclophosphamid. Dabei kam es zu Resorptionen, jedoch nicht zu Mißbildungen. In einer zweiten Serie erhielten die Muttertiere eine Dosis von 8-10 mg/kg am 10. und 11. Tag der Gestation. Die Resorptionsrate betrug hier 100 %.

In einer dritten Serie wurden die Muttertiere am 15. oder 16. Tag mit 15-30 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei den Feten traten unterschiedliche Mißbildungen auf wie Brachygnathie, Protrusion der Zunge, spitze Nasen bei allen Feten, vereinzelt Exencephalie, offene Augen, Schwanzdefekte, Skelett- und Gliedermißbildungen und Ulcerationen der Haut. Am 15. Tag kam es häufiger zu Mißbildungen als am 16. Tag der Gestation.

2.4.2.4 Beim Kaninchen

GOTTSCHEWSKI und ZIMMERMANN (1963) zeigten in Versuchen, daß schon von der Bildung des ersten Keimblasenlumens an chemische Substanzen in die Fruchtblase eindringen und den Keim schädigen können. Einmalige intravenöse Injektionen von 40 mg/kg Cyclophosphamid bis zum 9. Tag der Gestation erzeugten bei den Feten Organverdoppelungen und Aplasien einzelner Organe. Die Autoren glaubten, daß die Ursache für die Mißbildungen nicht ein spezifischer teratogener Effekt des Cyclophosphamid sei, sondern in der Labilität der Anlage während der phänokritischen Phase der Embryonalentwicklung zu suchen sei. Cyclophosphamid wirkt demnach phasenspezifisch, nicht organspezifisch.

GOTTSCHEWSKI (1963) verabreichte schwangeren Kaninchen neben anderen Substanzen auch Cyclophosphamid intravenös in einer einmaligen Dosis von 40 mg/kg und zwar 19, 20, 27 und 28 Stunden post coitum sowie am 3. Tag der Gestation und danach in halbtägigen Intervallen bis zum 9. Tag. Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese des Verfassers, daß die einzelnen Organe zu bestimmten Zeiten ihrer Entwicklung in der jeweiligen spezifischen Determinationszeit mit Mißbildungen reagieren.

GERLINGER (1964) gab schwangeren Kaninchen vom 10. Tag bis zum 13. Tag der Gestation verschiedene Dosen von Cyclophosphamid. Bei 300 mg/die starben die Muttertiere nach der 2. Injektion. Bei 100 mg/die waren alle Keime resorbiert. Bei Dosen von 50 mg/die kam es bei 6 Muttertieren zu 42 hypotrophen und brachymelen Embryonen, 30 hatten eine Gaumenspalte, 2 weitere Dysplasien des Gesichtsschädels. Bei 30 mg/die trugen die Embryonen nur geringfügige Retardierungszeichen. Bei 20 mg/die hatten 2 von 22 Embryonen eine einseitige Ablepharie. Bei 10 mg/die waren 8 Embryonen eines Muttertieres normal, während von den Embryonen des zweiten Muttertieres 5 eine Gaumenspalte und 4 eine Syndaktylie an den Hinterpfoten aufwiesen. Bei 2 mg/die waren alle 12 Embryonen zweier Muttertiere normal. Bei 1 mg/die hatte 1 von 14 Embryonen eine Gaumenspalte. GERLINGER erklärte die Dosis von 50 mg zur optimal embryotoxischen Dosis. Mit dieser Dosis führte er weitere Untersuchungen durch, um den Zeitraum, in dem embryotoxische Wirkungen von Cyclophosphamid zu erwarten sind, festzustellen. Er gab hierfür den 6. bis 13. Gestationstag an.

FRITZ und HESS (1971) untersuchten die Wirkung von Cyclophosphamid auf die embryonale Entwicklung beim Kaninchen vom 6. bis zum 14. Tag der Gestation. Sie verabreichten den gemischtrassigen Kaninchen eine Dosis von 30 mg/kg Cyclophosphamid intravenös. Bei Injektion vor dem 6. Tag waren keine Unterschiede zu Kontrollen beobachtet worden. An den Tagen 6-8 und 9-11 kam es vermehrt zu Resorptionen. An den Tagen 12 bis 14 wurde die Resorptionsrate nicht beeinflußt. Nach Behandlung am 7. Tag der Gestation waren 10 % mißgebildet, vorwiegend mit Omphalocelen. An den Tagen 8-9 bestanden hinsichtlich der Mißbildungen keine Unterschiede zu den Kontrollen. Am Tag 11 wiesen 30 % der Feten Mißbildungen auf. Diese waren Lippen-, Kiefer- und Gaumen-

spalten. Am Tag 12 zeigten alle Feten Oligo- und Brachydaktylien vornehmlich der Vorderpfoten. Am 13. Tag fanden sich bei 78 % der Feten Mißbildungen im Bereich der Hinterpfoten. Am 14. Tag der Gestation waren die Feten der behandelten Muttertiere im Vergleich zur Kontrolle unauffällig. In den Gruppen mit einer hohen Mißbildungsrate war das durchschnittliche Gewicht erniedrigt. Das Auftreten zweier Häufigkeitsgipfel an Embryoletalität und Mißbildungen erklärten die Autoren mit der unterschiedlichen Ernährungsbedingung in der histiotrophen und der hämatotrophen Phase.

2.4.2.5 Beim Menschen

Bei der zytostatischen Behandlung weiblicher Patienten kommt es häufig zu reversiblen Amenorrhoen. Eine Konzeption ist dann meist nicht möglich. Außerdem wird diesen Patientinnen zu kontrazeptiven Maßnahmen bzw. zur Abstinenz geraten. Während der langen Zeit des therapeutischen Einsatzes von Cyclophosphamid ereigneten sich allerdings mehrfach Konzeptionen. Einerseits wurde daraufhin die Therapie abgestzt, andererseits wurde eine Interruptio eingeleitet. In einigen Fällen aber wurde eine bestehende Schwangerschaft nicht abgebrochen.

GREENBERG und TANAKA berichteten 1964 über eine junge Frau mit Lympnogranulomatose, die über dem Mediastinum und der linken Hüfte röntgenbestrahlt worden war und nach einer zur selben Zeit eingetretenen Schwangerschaft ein normales Mädchen gebar. Während einer zweiten unerkannt gebliebenen Schwangerschaft erhielt die Patientin etwa zum Zeitpunkt der Konzeption eine tägliche orale Dosis von 100 mg Cyclophosphamid. Die Cyclophosphamid-Therapie wurde während der 6.-7. Woche

durch Gabe von 2,5 mg/kg über fünf Tage und einer einmaligen Dosis von 15 mg/kg intensiviert. In diese Zeit fällt die Entwicklung der Extremitäten. Nach Erkennung der Schwangerschaft im 3. Monat wurde für den Rest der Schwangerschaft die Cyclophosphamid-Dosis ohne Änderung weitergegeben. Die Patientin wurde dann von einer männlichen Frühgeburt (1,2 kg) entbunden, die folgende Fehlbildungen aufwies: 4 Zehen an jedem Fuß, eine Gaumenspalte, ein abgeflachter Nasenrücken, leichte hypoplastische Mittelphalanx des 5. Fingers und beiderseits Inguinalhernien. Die Entwicklung war für eine Frühgeburt entsprechend.

LOPES CARDOZO veröffentlichte 1963 in einer Fallbesprechung, daß einer Patientin während der ganzen Gravidität Cyclophosphamid gegeben wurde und keine Fruchtschäden irgendeiner Art auftraten.

GIL GAYARRE, LARRUGA REY und GIL BAYARRE (1963) behandelten eine Patientin mit Zahnfleischkarzinom. Die Frau gab nach 2-monatiger Cyclophosphamid-Therapie an, daß sie seit 5 1/2 Monaten schwanger sei. Die Geburt des Kindes erfolgte termingerecht. Es starb jedoch 3 Tage später, zeigte aber keinerlei Fehlbildungen.

LACHER und GELLER (1966) gaben bei einer 32-jährigen Schwangeren mit Lymphogranulomatose Bericht über die kombinierte Anwendung von Cyclophosphamid und Vinblastin im 2. Trimenon, etwa in der 18. Schwangerschaftswoche. Die Dosierung von Cyclophosphamid lag bei 80 mg intravenös täglich, danach bei 50 und 100 mg täglich per os, die Dosierung von Vinblastin lag zwischen 5 und 10 mg täglich. In der 37. Woche wurde ein offenbar normales männliches Kind geboren. Bis ein Jahr nach der Geburt wurden keine Besonderheiten bei dem Kind auffällig.

MEHTA und VAKIL (1966) berichteten über eine 26-jährige Zweitpara, die von der 30. Schwangerschaftswoche an mit 200 mg Cyclophosphamid 12 Tage lang intravenös, danach oral weiterbehandelt wurde. Die Patientin wurde von einem 2,5 kg schweren Knaben entbunden, der sich auch über 8 Monate normal entwickelte. Das Blutbild des Kindes war normal.

KINI, SIVAKUMAR und PAI (1965) beschrieben unter anderen Fällen eine Patientin mit Lymphogranulomatose, die mit 5 g Cyclophosphamid über 25 Tage im 8. Schwangerschaftsmonat therapiert wurde. Das Kind wurde termingerecht geboren und zeigte keinerlei Krankheitszeichen.

KNÖRR, KNÖRR-GÄRTNER und UEBELE-KALLHARDT (1969) berichteten über eine 31-jährige Erstgravida, die wegen eines Osteochondrosarkoms von der 6. bis 10. Schwangerschaftswoche mit insgesamt 4,35 g Cyclophosphamid per os therapiert wurde. Nach einer Interruptio zeigte sich der weibliche Fet in einem zeitgerechten Entwicklungszustand. Weder makroskopisch noch mikroskopisch waren von der Norm abweichende Besonderheiten festzustellen. Die Verfasser wiesen darauf hin, daß während einer Cyclophosphamid-Behandlung trotz der Diskrepanz in der embryotoxischen Wirkung zwischen Versuchstier und Mensch bei der klinischen Anwendung eine Konzeptionsverhütung durchgeführt werden sollte.

COATES veröffentlichte 1970 den Fall einer 26-jährigen Frau mit nephrotischem Syndrom, der versehentlich in den ersten 8 Wochen ihrer ersten Schwangerschaft 150 mg Cyclophosphamid täglich per os verordnet worden waren. Sie wurde von einem normalen Kind entbunden. Im Anhang wird eine Mitteilung von SEAH CHENG SIANG (Singapur) referiert, der eine Frau mit Erythematodes

während der ersten Wochen ihrer Gravidität unbeabsichtigt 400 mg Cyclophosphamid wöchentlich intravenös verabreichte. Das Kind war normal entwickelt.

TOLEDO, HARPER und MOSER (1971) behandelten eine 23-jährige Frau mit Morbus Hodgkin 6 1/2 Wochen nach Eintritt einer Schwangerschaft 4 Tage lang mit 560 mg Cyclophosphamid intravenös. Nach einer Pause von 17 Tagen erhielt die Patientin über 2 Monate weiterhin 100-150 mg Cyclophosphamid täglich per os. Während der 2.-6. Woche der Schwangerschaft waren eine Unmenge von röntgenologischen Untersuchungen durchgeführt worden. Nach einer Interruptio fiel beim Feten das Fehlen fast aller Zehen auf. Autoptisch fand sich eine einzelne linke Koronararterie. Das Skelett zeigte keine Mißbildungen. Die Autoren diskutierten, daß lediglich GREENBERG und TANAKA (1964) Zehenmißbildungen nach Einnahme von Cyclophosphamid beobachtet hatten, jedoch bisher noch keine Herzmißbildungen beschrieben wurden. Das Auftreten eines Herzfehlers führten sie daher auf die Röntgenuntersuchungen zurück.

DUBOIS-FERRIERE schrieb 1970 über eine Patientin mit einer Lymphogranulomatose, daß sie bei einer Langzeittherapie mit Cyclophosphamid über 9 Jahre im 7. Jahr ein normales Kind gebar.

Die aufgeführten Beobachtungen lassen nur wage Rückschlüsse über die Teratogenität von Cyclophosphamid beim Menschen zu, weil Cyclophosphamid hier nur bei niedriger Dosierung und häufig in Verbindung mit zusätzlichen therapeutischen Maßnahmen verabreicht wurde.

3. P R O B L E M A T I K DER EMBRYOTOXISCHEN WIRKUNG VON CYCLOPHOSPHAMID

Bei den meisten Untersuchungen zur embryotoxischen Wirkung von Cyclophosphamid wurde der Einfluß von Diffusion, Resorption, Transport, Verteilung und Metabolismus im mütterlichen Gewebe als auch die Frage des qualitativen und quantitativen Durchtritts von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten zum Embryo nicht näher untersucht.

Untersuchungen zum embryotoxischen Wirkprinzip von Cyclophosphamid wurden von GIBSON und BECKER (1969, 1971) und MURTHY, BECKER und STEELE (1973) durchgeführt. GIBSON und BECKER (1969) testeten mögliche Abbauprodukte auf ihre Embryotoxizität, wiesen aber keine Parallelen zur embryotoxischen Wirkung von Cyclophosphamid nach. Erst nach genauerer Aufklärung des Metabolismus durch SLADEK (1973) und anderen Autoren konnte man erkennen, daß keine der durch GIBSON und BECKER (1969) getesteten Substanzen beim Cyclophosphamid-Abbau gebildet werden. 1971 erhielten GIBSON und BECKER nach Anregung und Hemmung des Metabolismus von Cyclophosphamid in der Leber des Muttertieres bei Erhöhung der Metabolitenmenge eine Verringerung, bei Verminderung der Metabolitenmenge eine Steigerung der embryotoxischen Wirkung. Die Autoren schlossen daraus, daß die embryotoxische Wirkung eher auf unverändertes Cyclophosphamid zurückzuführen sei und es möglicherweise erst im Embryo zu embryotoxischen Substanzen enzymatisch abgebaut würde. Nach Untersuchungen an makromolekularen Strukturen des Mäuseembryos folgerten MURTHY, BECKER und STEELE (1973), daß Cyclophosphamid oder aber auch seine Metabolite über eine Alkylierung der embryonalen DNS embryotoxisch wirken würde.

Diese wie auch andere Untersuchungen mit radiomarkiertem Cyclophosphamid lassen keine Aussage darüber zu, ob Cyclophosphamid selbst oder einer seiner Metabolite embryotoxisch wirkt, da mit dieser Methode nicht zwischen den sich ähnelnden Substanzen unterschieden werden kann. Mit dem herkömmlichen Verfahren der Chromatographie in Verbindung mit einer Farbreaktion sind jedoch Cyclophosphamid und die bekannten Abbauprodukte zu unterscheiden.

Es ist bekannt, daß die Abbaurate von Cyclophosphamid für jede Tierspezies unterschiedlich ist. Demnach sind auch die Konzentrationen von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Blut und in den Geweben bei den einzelnen Tierarten verschieden. Dies hat sicher eine Bedeutung für die Embryotoxizität dieser Substanz. Es ist daher wichtig zu wissen, in welcher Menge und in welcher Relation zueinander die einzelnen Metabolite in Abhängigkeit von der Zeit bei einer bestimmten Versuchstierart gebildet werden.

Durch Untersuchungen am Keimanlagenmaterial erfährt man, welche der Substanzen die Mutter/Embryo-Schranke zu passieren vermag. Da die Plazenta und die vor der Plazentareife bestehende Dottersackwand zum größten Teil Lipoproteinstrukturen aufweist (MIRKIN, 1973), können polare Substanzen schlechter penetrieren als lipophile. An Protein gebundene Substanzen als auch solche mit einem Molekulargewicht über 600 sind relativ impermeabel.
GIBSON und BECKER (1971) glaubten, daß unverändertes Cyclophosphamid durch enzymatischen Abbau im Embryo embryotoxisch wirken könnte. Die Untersuchungen zur Embryotoxizität am Hühnchenkeim von SINGH, TULI und GUPTA (1971)

scheinen diese Hypothese zu bestätigen, obwohl mehrere Gründe gegen eine Übertragung der am Hühnchenkeim gewonnenen Ergebnisse auf den Säuger sprechen. In das Ei injiziertes Cyclophosphamid verbleibt bis zur Ausreifung des Hühnchens im Ei. Das Ei selbst besitzt ein vollständiges Enzymmuster, da sonst eine Entwicklung des Hühnchenembryos in diesem nach außen geschlossenen System nicht möglich wäre. Zudem gehört das Hühnchen phylogenetisch zum Stamm der Vögel und hat somit wenig gemein mit den anderen genannten Versuchstieren, die den Säugern zugezählt werden. Um in Erfahrung zu bringen, ob unverändertes Cyclophosphamid im Embryo zu teratogenen Substanzen weiter abgebaut wird, muß die unveränderte Substanz unter Umgehung einer Metabolisierung durch das Muttertier direkt am Embryo verabreicht werden. Daraufhin wird das Keimanlagenmaterial auf mögliche Metabolite untersucht. Außerdem ist der Konzentrationsabfall des applizierten Cyclophosphamids zu beobachten, um eine Aussage über die Dauer der Cyclophosphamid-Einwirkung auf den Embryo machen zu können.

Ferner soll Cyclophosphamid als unveränderte Substanz direkt am Embryo auf seine eigentliche Embryotoxizität getestet werden. Unter Umgehung des mütterlichen Organismus und der Plazenta wird bei der direkten Applikation am Keim die zu untersuchende Substanz während einer kurzfristigen Operation je nach Entwicklungsstadium in die Dottersack- bzw. Amnionhöhle eingebracht. Untersuchungen mit der Amnionmethode wurden von LAW 1940, TRASLER et al. 1956 und DOSTAL 1970 bei der Maus, von TURBOW und CHAMBERLAIN 1968 und SCOTT 1970 bei der Ratte und von DIDCOCK et al. 1956 beim Kaninchen durchgeführt. In die Amnionhöhle kann erst zu einem späten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung injiziert werden; dann haben einige Organe ihre sensible Phase bereits durchlaufen. Mit der einfacheren Dotter-

sackmethode kann man bereits zu einem früheren Zeitpunkt, an dem der Embryo auf embryotoxische Noxen maximal empfindlich reagiert, Untersuchungen durchführen (CLAUSSEN und BROEDERSDORFF 1974, CLAUSSEN und BREUER 1975 beim Kaninchen). Zu dem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung, zu dem die Plazenta gerade angelegt wird, hat der Dottersack seine größte Ausdehnung erreicht. Der Nahrungstransport vom Muttertier zum Embryo verläuft hierbei über die Dottersackflüssigkeit. Bei der Anwendung der direkten Applikationsmethoden ist die Extrapolation der Ergebnisse vom Embryo des Versuchstieres auf den menschlichen Embryo leichter, weil die ontogenetischen Unterschiede in diesem Entwicklungsstadium als relativ gering erachtet werden können.

4 MATERIAL UND METHODE

4.1 Versuchsaufbau und Übersicht

In den vorliegenden Untersuchungen wurden weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer (Kaninchenfarm Bostrop, Meerbusch-Bösinghoven bei Düsseldorf) als Versuchstiere eingesetzt. Die Kaninchen wurden unter Standardbedingungen in Einzelboxen gehalten und mit Trockenfutter der Firma Höveler sowie Wasser ad libitum ernährt. Die weiblichen Kaninchen wurden durch ebenfalls reinrassige Rammler der gleichen Zucht im Natursprungverfahren doppelt belegt (Tag 0 der Gestation). Am 9. Tag der Gestation wurde geprüft, ob eine Schwangerschaft bestand. Die Keimanlagen ließen sich als haselnußgroße Gebilde von prall-elastischer Konsistenz im mittleren Unterbauch tasten und ihre Anzahl abschätzen. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

1. Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial am 9. Tag der Gestation nach intravenöser Applikation: Hierbei kamen drei verschiedene Dosen von Cyclophosphamid (Endoxan^{R}, Asta-Werke, Bielefeld) zur Anwendung:

a) Die Dosis von 20 mg/kg Cyclophosphamid. Nach Untersuchungen von SCHROERS (1978) erwies sich diese Dosis beim Kaninchen gegenüber der Kontrolle als embryotoxisch wirksam.

b) Die Dosis von 80 mg/kg Cyclophosphamid. Die Dosis ist nach Untersuchungen von SCHROERS (1978) stark embryotoxisch. Vor allem ist hierbei eine erhöhte Resorptionsrate auffällig.

c) Die Dosis von 320 mg/kg Cyclophosphamid. Dies ist eine supraletale Dosis, die über der doppelten LD_{50} beim Kaninchen liegt (LD_{50}Kaninchen ca. 150 mg/kg i.v.)

Die qualitative und quantitative Trennung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial erfolgte dünnschichtchromatographisch in Verbindung mit einer quantitativ erfaßbaren Farbreaktion, dem NBP-Test. Ein weiterer Metabolit des Cyclophosphamids, das Acrolein, ist mit dieser Methode nicht zu erfassen. Zu seiner Bestimmung bedarf es einem veränderten Vorgehen bei der Gewinnung der Proben aus dem mütterlichen Serum und der Dottersackflüssigkeit und einem fluorimetrischen Meßverfahren.

2. Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen nach direkter Applikation von Cyclophosphamid in den Dottersack: Hierbei wurden drei verschiedene Dosen, die den intravenös verabreichten Dosierungen, bezogen auf das durchschnittliche Keimanlagengewicht am 9. Tag der Gestation von ca. 1 g, gewichtsadäquat waren, intraoperativ in den Dottersack der Keimanlage appliziert:
a) 20 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage.
b) 80 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage.
c) 320 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,02 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage
Die qualitativen und quantitativen Bestimmungen erfolgten ebenfalls dünnschichtchromatographisch mit Hilfe des NBP-Testes.

3. Teratologische Untersuchung mit unverändertem Cyclophosphamid unter Umgehung des mütterlichen Kreislaufs und der Plazenta direkt am Embryo des Kaninchens am 9. Tag der Gestation (Dottersackmethode):
Während einer Äther-Sauerstoff-Narkose wurde schwangeren

Kaninchen am 9. Tag der Gestation drei verschiedene Dosen unverändertes Cyclophosphamid intraoperativ in den Dottersack der Keimanlagen eines Hornes des Uterus bicornis appliziert:
a) 20 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage
b) 80 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage
c) 320 µg Cyclophosphamid, gelöst in 0,02 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro Keimanlage.
In den Dottersack der Keimanlagen des anderen Hornes des Uterus bicornis wurde die gleiche Flüssigkeitsmenge als Kontrolle eingebracht (siehe 4.4.2).
Nach Tötung des Muttertieres am 28. Tag der Gestation wurde der Uterus bicornis auf Resorptionen und die Feten auf Mißbildungen untersucht. Das Gewicht der Feten wurde bestimmt und ihre Scheitel-Steiß-Länge ermittelt. Eine röntgenologische Untersuchung schloß sich an.

4.2 Bestimmungen von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen

Zu bestimmten Zeiten, d.i. 1/2, 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 Stunden, nach intravenöser Injektion einer entsprechenden Dosis Cyclophosphamid (20, 80 und 320 mg/kg Körpergewicht) in eine Ohrvene der schwangeren Kaninchen wurde aus einer anderen Ohrvene ca. 8 ml Blut entnommen. Zusätzlich wurde nach 1/2, 1 und 1 1/2, 6, 9, 24 Stunden jeweils ein Muttertier durch Genickschlag getötet, der Bauchraum eröffnet und die Dottersackflüssigkeit zusammen mit dem Embryo mittels einer Flügelkanüle (Ø 1,5 mm) entnommen. Das so gewonnene Material aller Keimanlagen eines Muttertieres wurde in ein Reagenzglas gegeben und kurzzeitig durch

Ultraschall homogenisiert. Die Flüssigkeitsmenge wurde gemessen und die Anzahl der Keimanlagen pro Versuchstier notiert, um die mittlere Flüssigkeitsmenge pro Keimanlage genau errechnen zu können. Dann wurde das Keimanlagenmaterial (Dottersackflüssigkeit plus Embryo) wie auch das vom entnommenen Blut erstellte Serum etikettiert und bei -30°C aufbewahrt.

4.2.1 Dünnschichtchromatographische Trennung von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten

Die aus den verschiedenen Untersuchungen erhaltenen Proben galt es nun qualitativ als auch quantitativ auf ihren Gehalt an Cyclophosphamid und seinen Metaboliten aufzuschlüsseln. VOELCKER, DRAEGER, PETER und HOHORST (1974) entwickelten mit der Dünnschichtchromatographie auf Propandiol-(1,3)-imprägnierten Zelluloseplatten die wohl zur Zeit beste Methode zur Trennung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten. Nach diesem Verfahren erfolgten auch in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen am mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen.

Jede eingefrorene Probe wurde langsam aufgetaut und 1 ml Serum bzw. die gemittelte homogenisierte Flüssigkeitsmenge einer Keimanlage abpipettiert. Dieses Material wurde zur Enteiweißung mit Aceton 1+9 geschüttelt und bei 3400 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Für die Dünnschichtchromatographie mußte die enteiweißte Probe eingeengt werden. Deshalb wurde der erhaltene Überstand in einen Rotationskolben überführt und in einem Eiswasserbad tauchend mittels eines Vakuumrotationsverdampfers bis auf 50 µl reduziert. Dieser Bruchteil eines Tropfens wurde dann in eine gekühlte

Lambda-Haarpipette aufgezogen und auf eine 30 %ige Propandiol-(1,3)-imprägnierte Zelluloseplatte (20 x 20 cm, Schichtdicke 0,10 mm, Fa. Merck, Nr. 5716) aufgetragen.

Die Imprägnierung der Zelluloseplatten erfolgte nach Abschaben einer 1,0 cm breiten Zone an drei Plattenkanten. Je zwei Platten wurden mit der Zelluloseschicht so gegeneinander fixiert, daß ein ca. 1 mm breiter Spalt entstand. Dann wurden die aufeinander fixierten Platten in einer Wanne mit 30 %igem Propandiol-(1,3) in Methanol 5 Minuten imprägniert. Anschließend wurde das überschüssige Methanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur exsikkiert. Die imprägnierten Platten wurden schließlich 10 Minuten bei 4°C in einer Kammer über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet.

Die eingeengte Probe wurde auf eine Platte, die auf einem Kühltisch lag, ca. 3 cm vom unteren Rand strichförmig aufgetragen. Nach 10-minütigem Trocknen über konzentrierter Schwefelsäure wurde ein u-förmiger Papprahmen auf den freigelegten Rand gesetzt und darauf eine gleichgroße Glasplatte gelegt. Auf die eine Seite des gebildeten Sandwichs wurden zwei Federklammern gesteckt, auf die andere Seite kam der mit zwei Klammern versehene Ständer. Das Ganze wurde mit der unten offenen Seite in einen Trog mit Äthylacetat als Laufmittel gesetzt. Die Sandwichkammer (Fa. Camag, Muttenz/Schweiz) wurde bei ca 4°C im Kühlschrank aufgestellt. Die Laufzeit bis zur Erreichung des maximalen Rf-Wertes betrug ca. 1 1/2 Stunden. Durch die Präparation der Platte wurde der Chromatographievorgang verzögert und dadurch eine bessere Trennschärfe bewirkt. Die Rf-Werte für Cyclophosphamid und seine Metabolite wurden von VOELKER et al. (1974) mit folgenden Werten angegeben:

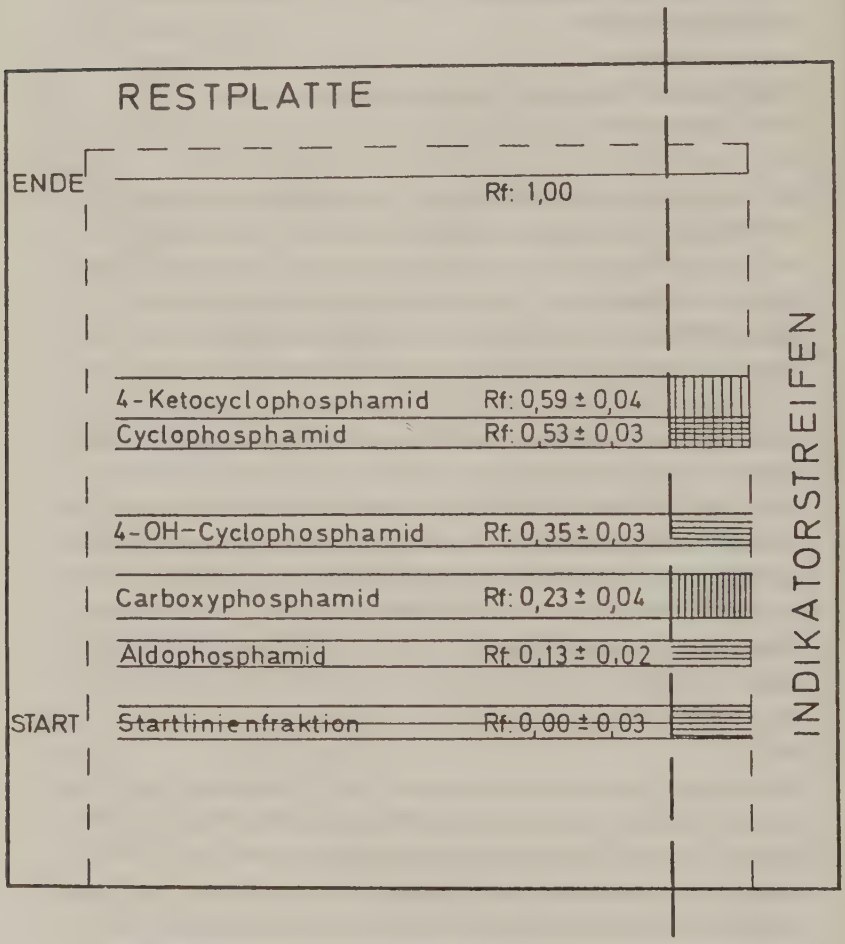
4-Keto-Cyclophosphamid	0,59 ± 0,04
Cyclophosphamid	0,53 ± 0,03
4-Hydroxy-Cyclophosphamid	0,35 ± 0,03
Carboxyphosphamid	0,23 ± 0,04
Aldophosphamid	0,13 ± 0,02
Startlinienfraktion (Friedmansäure und weitere Folgeprodukte)	0,00 ± 0,04

Da Cyclophosphamid und das 4-Keto-Cyclophosphamid durch die Dünnschichtchromatographie nach VOELKER et al. nicht sauber zu trennen waren - ihre Rf-Werte überschneiden sich leicht - wurde eine erneute Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit einem 1-Butanol/Benzol-Gradienten durchgeführt.

Nach der Entwicklung wurde die Chromatographieplatte schnell aus dem Sandwich befreit und das Laufmittel Äthylacetat mit dem Föhn abgeblasen. Um ein nachträgliches Zerfließen der Chromatographiezonen zu verhindern, wurde die Platte stets senkrecht gehalten. Mit einem Glasschneider wurde dann ein ca. 2 cm breiter Glasstreifen als Indikator vom seitlichen Rand der Platte abgetrennt und die Restplatte kühl und trocken gelagert.

Zur Identifizierung alkylierender Substanzen auf dem Indikatorstreifen wurde derselbe mit 0,025 n Acetat-Puffer (pH 4,6) und anschließend mit 2,5 %iger NBP-Lösung in Aceton (erhältlich bei EGA-Chemie, Steinheim) besprüht. Alkylierende Substanzen werden nach einer nochmaligen Besprühung mit 0,25 n Natronlauge als verschieden getönte blaue Flecken sichtbar. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 mµ Mol. Der Indikatorstreifen wurde dann mit der Restplatte wieder zusammengelegt und die einzelnen Zonen mit ihren Grenzen auf der Restplatte markiert. Dieser Vorgang ist in nötiger

Abbildung 5 : SKIZZE ZUR CHROMATOGRAPHIE



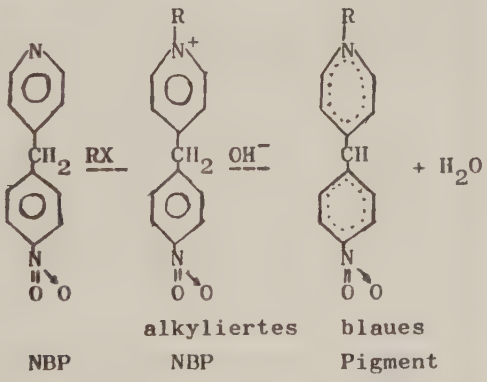
Eile und mit Sorgfalt durchzuführen, weil die Färbung nach über 5 Minuten vergeht. Die gekennzeichneten Zellulosesschichten (siehe Abbildung 5) wurden separat abgetragen und in nach ihren Rf-Werten geordneten Schliffkölbchen überbracht und verschlossen. Die

Gesamtmenge an chromatographierbarer Substanz beläuft sich für die ganze Platte berechnet auf maximal 5 µMol, d.i. bezogen auf die entsprechande Cyclophosphamid-Menge um die 1000 µg. Anschließend wurde die quantitative Bestimmung der einzelnen Substanzen mit dem NBP-Test durchgeführt.

4.2.2 Quantitative Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten mit dem NBP-Test

FRIEDMAN und BOGER (1961) entwickelten eine Methode zur colorimetrischen Bestimmung alkylierender Agentien in wässrigen Medien. Die Farbreaktion beruht auf einer Alkylierungsreaktion des 4-(p-nitrobenzyl)-Pyridins (NBP) durch Alkylhalogenide, die leicht ein Halogenatom abspalten können.

Reaktionsschema:



Cyclophosphamid und seine Metaboliten besitzen unterschiedliche alkylierende Aktivität (siehe Tabelle 1). Sie müssen vor der eigentlichen Farbreaktion hydrolysiert werden. Hierdurch werden die einzelnen Metabolite sowie das Cyclophosphamid in maximal alkylierende Substanzen überführt. Durch photometrische Erfassung der alkylierenden Aktivität können die einzelnen Substanzen mengenmäßig miteinander verglichen werden.

Tabelle 1 : PHARMAKOLOGISCHE AKTIVITÄTSBESTIMMUNGEN VON N-LOST-VERBINDUNGEN (n. BROCK, 1975)

N-Lost-Derivat	Molekular-Gewicht	alkylierende Aktivität	Cl^-Freisetzung 1 val/mol/min	zytotoxische Aktivität	LD_{50}(Ratte) (mg/kg)
NH-Lost (Nor-Stickstofflost)	178,5	100	60	1,35	100
N-CH_3-Lost (Stickstofflost)	192,5	100	15	138	1,1
N-O-Lost (Mitomen)	208,6	100	180	1,5	60
Cyclophosphamid (Endoxan)	261,1	1,3	>7 Tage	<0,03	220
4-Keto-Cyclo-phosphamid	275,1	1,2	>7 Tage	<0,07	>800
4-Hydroxy-Cyclo-phosphamid	277,1	65	480	63	150
Carboxyphosphamid	293	85	>7 Tage	0,1	8oo
Friedmansäure	221	90	60	2,5	61
Acrolein	56,1	1,9	/	0,4	7,3

Zur Hydrolyse wurde die Trockensubstanz in dem Schliffkölbchen mit 0,7 ml Aqua bidest versetzt, 0,7 ml 1 n HCl hinzugegeben und fest verschlossen in einem siedenden Wasserbad für 10 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung in einem Eisbad wurde 0,7 ml 0,025 m Acetatpuffer (pH 4,6) hinzugefügt, der pH von 4,6 mit 1 n NaOH vorsichtig eingestellt (pH-Meter) und mit 0,3 ml 5 %igem NBP-Reagenz in Aceton versetzt im Wasserbad für 20 Minuten zum Sieden gebracht. Nachdem sich die Lösungen im Eisbad wieder abgekühlt hatten, wurden 3,5 ml Äthylacetat als organische Auffangphase und 1,4 ml Aceton zur Trennung von der wässrigen Phase beigefügt. Der darauf folgende Arbeitsgang mußte innerhalb von 5 Minuten durchgeführt werden, da der sich bildende Farbstoff instabil ist. 1,0 ml 0,25 n NaOH versetzte die Lösung ins Alkalische und bewirkte eine blaue bis violette Farbreaktion. Das Gemisch wurde ca. 20-mal gut durchgeschüttelt, 1 1/2 Minuten scharf zentrifugiert und ca. 3 ml der organischen Farbschicht wurden vorsichtig in eine Quartzküvette (d=2) abpipettiert. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 492 nm gegen einen mitgelaufenen Leerwert gemessen. Der Messfaktor wurde für die quantitative Bestimmung an hydrolysiertem Cyclophosphamid ermittelt und lag in dieser Arbeit bei x 65. Diese Konstante konnte genommen werden, weil sich bei der Standardeichung mit 9 Werten (Bereich $10^{2,2}$) ein lineares Verhältnis zwischen Photometer-Extinktion und der Menge an hydrolysiertem Cyclophosphamid zeigte.

Da ein Molekül des NBP-Reagenzes mit einem Molekül der hydrolysierten Substanz reagiert, kann man durch diese Eichung die Mol der einzelnen Metaboliten erhalten und so man will durch Multiplikation mit deren Molekulargewichten die Mengen der einzelnen Metaboliten berechnen.

4.2.3 Fluorimetrische Bestimmung des Cyclophosphamid-Metaboliten Acrolein im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit beim Kaninchen

Das bei dem Abbau des Aldophosphamids in die Friedmansäure entstehende Acrolein ist durch dünnschichtchromatographische Trennung und NBP-Test nicht zu erfassen. Deshalb wurde zur Bestimmung dieses Metaboliten eine von ALARCON (1968) beschriebene fluorimetrische Methode angewandt, mit der man Konzentrationen bis zu 0,03 µg Acrolein messen kann. Anstelle einer Überführung des Acroleins aus den zu untersuchenden Flüssigkeiten durch eine Waschflaschenkette wurde in dieser Arbeit ein Serum- bzw. ein Dottersackflüssigkeits-Leerwert mitlaufen gelassen.

Bei dieser Untersuchung kamen wiederum die drei Dosen von 20, 80 und 320 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht zur Anwendung. Jeder Dosis wurde ein schwangeres Kaninchen mit mehr als 12 tastbaren Keimanlagen zugeordnet. Diese Tiere wurden mit einer Äther/Sauerstoff-Narkose anästhesiert, der Bauchraum operativ eröffnet, die Dottersackflüssigkeit einer Keimanlage entnommen und der Bauchraum mit einer feuchten Platte abgedeckt. Am gleichen Tier wurde eine Vena femoralis frei präpariert, katheterisiert und ca. 3 ml Blut entnommen. Diese Proben dienten als Serum-, bzw. als Dottersackflüssigkeits-Leerwert. Nach 1/2, 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3, 3 1/2, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 Stunden sollten weitere Abnahmen von Blut und Dottersackflüssigkeit am narkotisierten Kaninchen erfolgen. Die mit 20 und 80 mg/kg behandelten Tiere verstarben nach 6 Stunden, das mit 320 mg/kg behandelte Tier verstarb in der 7. Stunde. Bei der Abnahme und Gewinnung von mütterlichem Serum und von Dottersackflüssigkeit wurde auf schnellstmögliche Bearbeitung geachtet, damit sich so

wenig wie möglich Acrolein aus den Flüssigkeiten verflüchtigt. Auf ein Einfrieren der Proben sowie auf eine Homogenisation der Dottersackflüssigkeit wurde verzichtet, stattdessen wurde sofort mit der chemischen Aufbereitung begonnen.

An Reagenzien wurden nur reinste Substanzen pro analysi verwandt, die mit dem Fluoreszenzreagenz m-Aminophenol keinerlei Verbindungen eingehen. 1 ml der zu untersuchenden Probe wurde in ein verschließbares Zentrifugenglas mit 0,5 ml 5 n HCl und 10 %iger Trichloressigsäure gegeben und 3 Minuten stark zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Schliffkölbchen überbracht, das mit 0,5 ml des Fluoreszenzreagenzes m-Aminophenol (250 mg auf 50 ml 1 n HCl) versetzt war. Das Schliffkölbchen wurde fest verschlossen für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad gegeben. Dabei bildet sich durch die Reaktion des Acroleins mit dem m-Aminophenol der fluoreszierende Stoff 7-Hydroxy-Chinolin nach folgendem Schema:

m-Aminophenol Acrolein 7-Hydroxy-Chinolin

Aus dem siedenden Wasserbad kommend wurde das Schliffkölbchen in einem Eisbad abgekühlt und die Lösung mit 0,6 ml 0,5 n NaOH versetzt. Der gebildete Fluoreszenz-Farbstoff ist stabil und die Probe kann verschlossen mehrere Tage gelagert werden.

Die fluorimetrische Acrolein-Bestimmung wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer FLUORISPEC Modell SF 100 der Firma BAIRD-ATOMIC durchgeführt. Die optimale Anregung für 7-Hydroxy-Chinolin lag bei 368 nm, die maximale Fluoreszenz bei 505 nm. Um feinere Messungen mit niedrigeren Acrolein-Konzentrationen zu bekommen, wurde über zwei Skalenbereiche mit zwei verschiedenen Einstellungen gemessen. Im Bereich von 0,03 bis 0,5 µg Acrolein wurde die Einstellung Coarse gain 30, fine gain 9 gewählt, für den Bereich von 0,5 bis 10 µg Acrolein die Einstellung Coarse gain 3, fine gain 6 genommen.

Bei der Erstellung der Eichgeraden wurde bei 7 Bestimmungen in Aqua bidest. von 13 Meßwerten ein lineares Verhältnis zwischen der Menge an Acrolein in µg und der Fluoreszenz in µA ermittelt. Auch andere Substanzen mit Aldehydfunktion und einer Doppelbindung können mit der zu dieser Bestimmung benötigten Substanz, dem m-Aminophenol, reagieren und die eigentliche Acroleinmessung beeinflussen. Deshalb ist die Differenz zwischen den Probenwerten zu den Leerwerten von Serum und Keimanlagenmaterial eines jeden Versuchstieres als die eigentliche Konzentration von Acrolein anzusehen.

4.3 Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Keimanlagenmaterial nach direkter Applikation in den Dottersack

Am 9. Tag der Gestation wurde schwangeren Kaninchen in einer Äther-Sauerstoff-Narkose der Bauchraum eröffnet und sämtliche Keimanlagen wurden mit einer von drei vorgegebenen Dosen Cyclophosphamid mittels einer Terumo-Mikroliterspritze behandelt. Die Dosen von 20 und 80 µg Cyclophosphamid waren in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, die Dosis von 320 µg Cyclophosphamid

wurde in einer Flüssigkeitsmenge von 0,02 ml physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Um ein Auslaufen der Dottersackflüssigkeit zu verhindern, erfolgte die Injektion in den Dottersack mit der sehr feinen Mikroliternadel tangential. Zu bestimmten Zeiten (1/4, 1/2, 1, 1 1/2, 2, 3, 4, 6 und 9 Stunden) nach Injektion von Cyclophosphamid in die Keimanlagen wurden die Muttertiere getötet und wie zuvor Keimanlagenmaterial entnommen, homogenisiert und eingefroren. Muttertiere, die eine Viertelstunde nach Cyclophosphamid-Injektion in den Dottersack zur Untersuchung des Keimanlagenmaterials anstanden, wurden in Narkose belassen und durch intracardiale Injektion von KCl getötet. Die anderen Muttertiere wurden operativ versorgt und zu den gegebenen Zeiten durch Genickschlag getötet. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung und die quantitative Bestimmung der zu untersuchenden Substanzen verlief nach demselben Verfahren wie die Untersuchung des Keimanlagenmaterials nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid beim Muttertier.

4.4 Direkte Untersuchung zur Embryotoxizität von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode beim Kaninchen

4.4.1 Applikation von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode

In der vorliegenden Untersuchung wurde das von CLAUSSEN und BROEDERSDORFF (1974) und CLAUSSEN und BREUER (1975) beschriebene Verfahren angewandt.

Die unter Standardbedingungen in Einzelkäfigen gehaltenen weiblichen Kaninchen waren durch männliche Tiere der gleichen Zucht doppelt belegt worden (Tag 0 der Gestation). Am 9. Tag der Gestation konnte durch Betasten der weiblichen Tiere im mittleren Unterbauch eine

bestehende Schwangerschaft gesichert werden. Die Keimanlagen ließen sich als haselnußgroße Gebilde von prallelastischer Konsistenz im Unterbauch fühlen und auch ihre Anzahl konnte grob abgeschätzt werden.

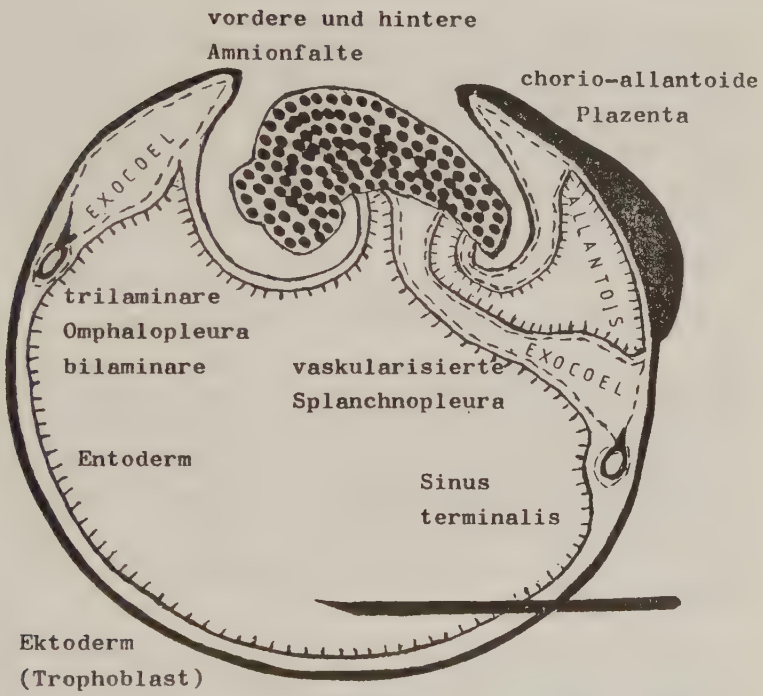
Zur Narkoseeinleitung wurden die schwangeren Kaninchen in eine dafür eigens vorgesehene Box gebracht, um die Tiere bei der ersten Begegnung mit der Äther-Sauerstoff-Narkose mittels einer Narkosemaske gegen ihre Abwehrreaktionen zu schützen, da es sonst bei den Tieren durch plötzliche Überstreckungen zu Wirbelfrakturen mit den daraus resultierenden Paresen kommen kann.

Um einen schnelleren Wirkungseintritt bei der Narkoseeinleitung zu erzielen, wurde der Äther-Verdunster "Vapor" der Firma DRÄGER auf ein Gemisch von ca 20 % Äther pro narcosi und 80 % Sauerstoff eingestellt. 3 bis 4 Minuten nach Narkosebeginn zeigten sich die Tiere genügend narkotisiert und relaxiert, so daß der Ätheranteil reduziert werden konnte.

Die Kaninchen wurden dann in Rückenlage auf einen für Kleintieroperationen vorgesehenen Tisch fixiert und das Bauchfell in einer Länge von ca. 10 cm und einer Breite von etwa 3 cm im Rectus-Bereich oberhalb der Symphyse rasiert. Die Desinfektion des Operationsgebietes geschah mit gefärbtem Dibromol.

Nach Abdeckung des Operationsgebietes mit einem sterilen Schlitztuch und Legen eines ca. 8 cm langen Hautschnittes wurde der Bauchraum in der Linea alba eröffnet. Der Uterus bicornis wurde aufgesucht und anhand der Bifurkationsstelle die Unterscheidung in rechtes und linkes Horn vorgenommen.

Abbildung 6 : SCHNITT DURCH DIE KEIMANLAGE EINES KANINCHENEMBRYOS (ca. 9. TAG DER GESTATION)
(nach GOTTSCHEWSKI und ZIMMERMANN 1973, verändert)



Die Öffnung der Injektionsnadel liegt im Dottersack.

Mit einer Terumo-Mikrolitерspritze wurde jeweils eine der drei verschiedenen Dosen von 20, 80 und 320 µg Cyclophosphamid in jeden Dottersack der ca. 1 g schweren Keimanlagen eines Hornes tangential injiziert. In die Keimanlagen des anderen Hornes wurde die entsprechende Flüssigkeitsmenge physiologische Kochsalzlösung zur Kontrolle eingebracht. Während die Dosis von 20 und 80 µg

Cyclophosphamid in 0,01 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst war, wurde für die Dosis von 320 µg Cyclophosphamid 0,02 ml des Lösungsmittels benötigt. Dementsprechend groß war auch die Kontroll-Lösungsmenge.

Nach Applikation der zu untersuchenden Substanz wurden das Peritoneum und die Bauchdecken durch eine fortlaufende Naht mit Seide verschlossen. Danach wurde die Ätherzufuhr abgestellt und eine Hautnaht angelegt. Nach den letzten Stichen kam das operierte Tier relativ schnell wieder zu sich und nahm bald seine gewohnte Hockstellung ein.

4.4.2 Beurteilung der Feten auf Mißbildungen

Am 28. Tag der Gestation, d.h. am 19. Tag nach der Operation, wurden die Muttertiere durch Genickschlag getötet und die Uteri entnommen. In einer Sektion wurde jedes Muttertier auf pathologische Veränderungen, besonders im Bereich des Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Niere als auch der Lunge makroskopisch untersucht.

Nach der Hysterektomie wurden die Feten von ihren Eihäuten befreit und die lebenden Feten in einer geschlossenen Glasschale durch Äther-Inhalation getötet. Die eröffneten Uteri ließen neben den Feten noch verschiedene Stadien von Resorptionen erkennen. Eine Resorption 1. Grades hat eine gefurchte Oberfläche und einen graugelblichen Farbton. Die entwicklungsgeschichtlich ältere Resorption 2. Grades unterscheidet sich von der ersteren durch ihre papulöse Form und ihre derbere Konsistenz. Keimanteile sind makroskopisch nicht erkennbar. Von diesen beiden Stadien ist die Resorption

3. Grades deutlich zu unterscheiden, weil sich hier Keimanteile erkennen lassen.

Die Resorptionen wurden gezählt, die Feten mit einer elektrischen Waage bei einer Genauigkeit von ± 0,1 g gewogen und die Scheitel-Steiß-Länge mit dem Stechzirkel auf ± 0,1 cm gemessen. Bei der Inspektion der Feten wurde auf folgende makroskopische Veränderungen geachtet: Form und Größe des Schädels und der Schnauze, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Sitz der Ohren, Fettverteilung und Proportionen am Rumpf, Länge des Schwanzes und Konfiguration der Extremitäten. Die vorderen Extremitäten weisen jeweils 5 Strahlen, die hinteren Extremitäten normalerweise je 4 Strahlen auf.

Danach wurde die Haut des Feten entfernt und der Bauchraum eröffnet. Mit einer Glassonde wurde zuvor geprüft, ob eine Ösophagus-Atresie und eine Analatresie bestand. Der Füllungszustand der Magen- und der Gallenblase sowie der Verlauf des Darmkanals wurde beobachtet. Die Leber füllt nahezu den gesamten oberen Bauchraum aus. Die Milz war unterhalb des Magens als längliches rotes Organ sichtbar. Die Nieren wurden aufgesucht und auf ihre Form, Lage und Größe untersucht. Die weißlichen Ureterstränge wurden bis zur Blase verfolgt. Die Thoraxorgane wurden in toto herausgezogen und ihre Form und Lage überprüft. Danach wurden die inneren Organe entfernt.

Die Beurteilung des Skelettsystems erfolgte röntgenologisch. Hierzu wurden einzelne Präparate hergestellt. Der Unterkiefer wurde vom Schädel abgetrennt, die Augen entfernt und die Orbita auf Seitendifferenz und Größe untersucht. Beträgt der Durchmesser der Orbita in der Horizontalen weniger als 6 mm, so würde dieses als Mikrophtalmie gewertet. Der Kopf wurde vom Rumpf gelöst,

die Kalotte durch einen Rundschnitt abgetrennt und das Hirn entfernt. Dabei wurde auf Seitendifferenzen und auf cerebrale Einblutungen geachtet. Die hinteren Extremitäten wurden nach Durchtrennung der Symphyse in der Mittellinie zusammen mit dem Beckenknochen von der Wirbelsäule abgenommen. Die vorderen Extremitäten wurden vorsichtig mit dem Schulterblatt und der Clavicula vom Stamm abgetrennt. Die Rippen wurden beidseits längs der hinteren Axillarlinie mit der Schere durchschnitten und das Sternum mit den Rippen abgesetzt. Übrig blieb die gesamte Wirbelsäule mit den Rippenansätzen.

Die einzelnen Präparate wurden zur röntgenologischen Untersuchung auf ein Kartonblatt gelegt. Vordere und hintere Extremitäten wurden so gesetzt, daß sich die Strahlen möglichst nicht überlagerten. Die so aufgebrachten Skeletteile wurden mit einem Mammographen (Einstellung: 25 kV, 35 mA, Belichtungszeit: 10 sec.) auf einem STRUKTURIX D4p-Film, AGFA, geröntgt (nach STERZ und NOTDURFT 1975, verändert).

4.4.3 Versuchsauswertung und Statistik

Die entwickelten Röntgenaufnahmen wurden auf verschiedene Arten von Mißbildungen wie Keilwirbel, Blockwirbel, Spaltwirbel, Aplasien und Dysplasien, Syndaktylien und Fehlzahl von Skelettanteilen untersucht. Außerdem wurden hypoplastische Formen in die Rubrik retardiert entwickelter Feten aufgenommen. Feten, deren Muttertiere während der Gestation erkrankten oder bei der Sektion krankhafte Veränderungen aufwiesen, wurden von der Statistik ausgeschlossen. Danach wurden die beobachteten Mißbildungen zusammengefaßt, die retardiert entwickelten Feten gezählt und eine Aufstellung aller Beobachtungen und ihre Zuordnung in die drei Serien unterschiedlicher

Cyclophosphamid-Dosen und ihrer jeweiligen Kontrolle vorgenommen. Weiterhin wurden in die Tabelle die Anzahl der Resorptionen, das Gewicht der Feten sowie ihre Scheitel-Steiß-Länge aufgenommen. Die statistische Auswertung der Resorptionsrate und der Mißbildungsfrequenz erfolgte mit dem Wilcoxon-Paardifferenzen-Test bei einseitiger Fragestellung und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Für die Auswertung bezüglich der Fetengewichte und ihrer Scheitel-Steiß-Längen wurde der Student-t-Test angewandt und das Signifikanzniveau auf p= 0,01 festgelegt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Ergebnisse nach Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation

Alle mit der Dünnschichtchromatographie erfaßbaren Metabolite des Cyclophosphamids wurden nach intravenöser Applikation von drei verschiedenen Dosen im mütterlichen Serum nachgewiesen und der Konzentrationsverlauf von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten verfolgt. Der Cyclophosphamid-Metabolit Acrolein konnte ergänzend mittels einer fluorimetrischen Methode bestimmt werden. Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung im Keimanlagenmaterial bzw. der fluorimetrischen Acrolein-Bestimmung in der Dottersackflüssigkeit konnten nach intravenöser Applikation drei verschiedener Cyclophosphamid-Dosen beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation innerhalb des Nachweisbarkeitsbereiches dieser Methoden lediglich Cyclophosphamid selbst und sein Metabolit Acrolein nachgewiesen werden.

In den Tabellen 2, 3 und 4 sind die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten im mütterlichen Serum nach Applikation von 20, 80 und 320 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht aufgeführt. In den Abbildungen 7, 8 und 9 sind die entsprechenden Konzentrationsverläufe aufgezeigt. Bei der Dosis von 20 mg/kg war eine mengenmäßige Trennung von Cyclophosphamid und den einzelnen Metaboliten bis zur 3. Stunde einschließlich möglich. Bei der Dosis von 80 mg/kg konnten die einzelnen Fraktionen im mütterlichen Serum

bis zur 5. Stunde, und bei der Dosis von 320 mg/kg bis zur 6. Stunde nach Injektion verfolgt werden. Danach erfolgten aufgrund der geringen Einzelkonzentrationen lediglich Bestimmungen der Gesamtmenge der mit dieser Methode zu untersuchenden Substanzen.

Nach intravenöser Verabreichung von 20 mg/kg (Tabelle 2, Abbildung 7) waren nach 1 1/2 und 3 Stunden zwei Konzentrationsgipfel zu verzeichnen, die vorwiegend durch eine Konzentrationserhöhung von unverändertem Cyclophosphamid verursacht wurden. Als Folge eines erhöhten Cyclophosphamidangebotes zeigte sich hier ein leichter quantitativer Anstieg aller alkylierfähiger Metabolite im mütterlichen Serum.

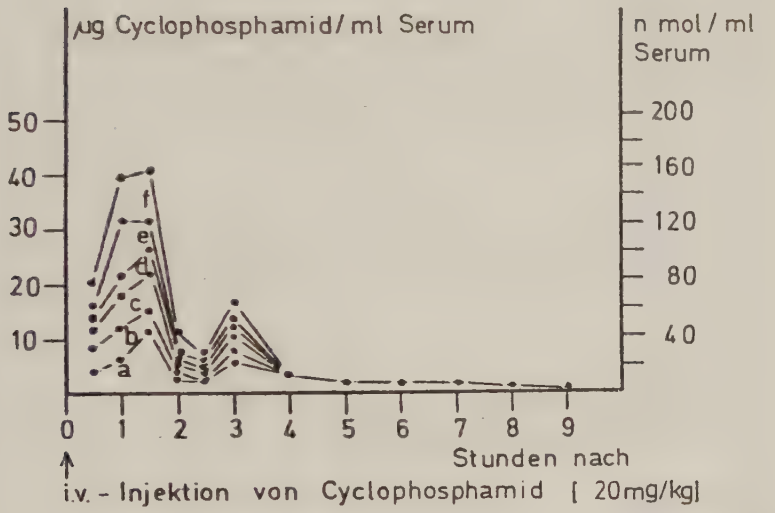
Nach intravenöser Verabreichung von 80 mg/kg (Tabelle 3, Abbildung 8) ließ sich ein ähnlicher Konzentrationsverlauf verfolgen. Außerdem war hier ein leichter dritter Konzentrationsanstieg von unverändertem Cyclophosphamid nach 2 Stunden festzustellen, der nicht mit einer Erhöhung von alkylierfähigen Metaboliten einherging. Beim Vergleich der Konzentrationsverläufe von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum nach Applikation von 20 und 80 mg/kg fällt auf, daß zum Zeitpunkt des ersten Konzentrationsgipfels bei Applikation von 80 mg/kg die maximale Gesamtkonzentration trotz vierfach höherer Dosis nur doppelt so hoch anstieg.

Dasselbe gilt für die etwa zum gleichen Zeitpunkt erreichte maximale Gesamtkonzentration von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten nach Applikation von 320 mg/kg gegenüber der vierfach geringeren Dosis von 80 mg/kg. Der Konzentrationsverlauf nach Verabreichung dieser Dosis (Tabelle 4, Abbildung 9) unterscheidet

Tabelle 2 : DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 20 mg/kg BEIM KANINCHEN

ZEIT in h	GESAMT µg/ml	CYCLO-PHOSPHAMID	4-KETO-PHOSPHAMID	4-HYDROXY-PHOSPHAMID	ALDO-PHOSPHAMID	CARBOXY-PHOSPHAMID	STARTLINIEN FRAKTION
1/2	20,5 100 %	4,2 20,5 %	4,2 20,5 %	3,6 17,6 %	2,3 11,2 %	2,0 9,8 %	4,2 20,5 %
1	39,5 100 %	6,5 16,5 %	5,9 14,9 %	5,9 14,9 %	3,3 8,5 %	9,8 24,8 %	8,1 20,5 %
1 1/2	40,7 100 %	11,7 28,7 %	3,6 18,7 %	6,8 16,7 %	4,6 11,3 %	4,6 11,3 %	9,4 23,1 %
2	11,1 100 %	2,6 23,4 %	1,3 11,7 %	1,3 11,7 %	0,7 6,3 %	1,3 11,7 %	3,9 35,1 %
2 1/2	7,2 100 %	2,6 35,1 %	0,0 0,0 %	1,3 18,1 %	0,7 9,7 %	1,3 18,1 %	1,3 18,1 %
3	16,7 100 %	5,9 35,3 %	2,0 12,0 %	3,0 18,0 %	1,6 9,6 %	1,3 7,8 %	2,9 17,4 %
4	3,2 100 %						
5	2,0 100 %						
6	2,0 100 %						
7	2,0 100 %						
8	1,3 100 %						
9	0,7 100 %						

Abbildung 7 : KONZENTRATIONSVERLAUF VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 20 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN



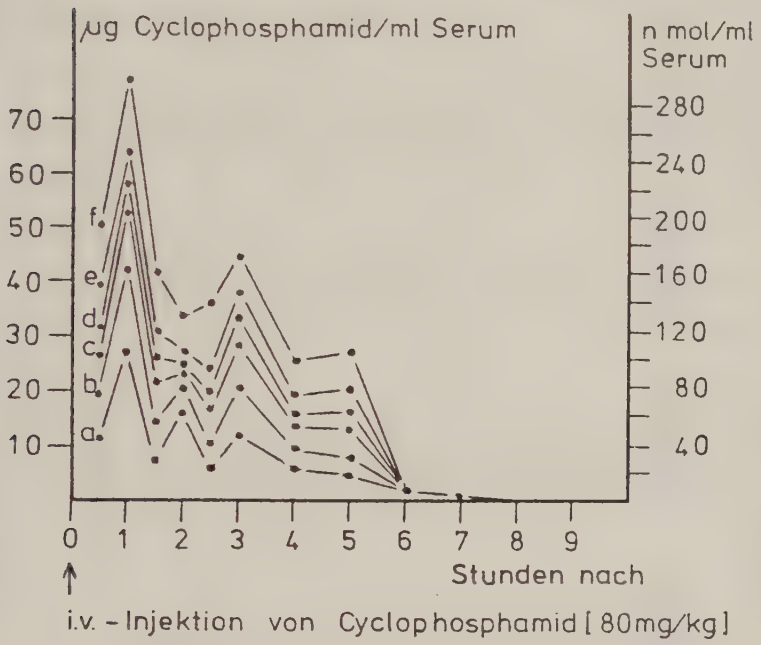
Legende :

f= Startlinienfraktion
e= Carboxyphosphamid
d= Aldophosphamid
c= 4-Hydroxy-Cyclophosphamid
b= 4-Keto-Cyclophosphamid
a= Cyclophosphamid

Tabelle 3 : DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 80 mg/kg BEIM KANINCHEN

ZEIT in h	GESAMT µg/ml	CYCLO-PHOSPHAMID	4-KETO-PHOSPHAMID	4-HYDROXY-PHOSPHAMID	ALDO-PHOSPHAMID	CARBOXY-PHOSPHAMID	STARTLINIEN FRAKTION
1/2	51,3 100 %	11,1 21,6 %	8,5 16,6 %	7,2 14,6 %	4,6 9,0 %	8,5 16,6 %	11,1 21,6 %
1	76,8 100 %	27,3 35,5 %	15,6 20,3 %	9,8 12,8 %	5,9 7,7 %	5,2 6,8 %	13,0 16,9 %
1 1/2	42,1 100 %	6,8 16,2 %	7,5 17,8 %	7,5 17,8 %	4,3 10,2 %	4,3 10,2 %	11,7 27,8 %
2	34,5 100 %	15,6 45,2 %	4,9 14,2 %	2,9 8,4 %	1,6 4,6 %	2,3 6,7 %	7,2 20,9 %
2 1/2	36,6 100 %	5,5 15,0 %	4,6 12,6 %	6,2 16,9 %	3,3 9,0 %	4,6 12,6 %	12,4 33,9 %
3	44,9 100 %	11,7 26,1 %	8,8 19,6 %	8,1 18,0 %	5,2 11,6 %	4,6 10,2 %	6,5 14,5 %
4	25,7 100 %	5,5 21,4 %	4,2 16,3 %	3,6 14,0 %	2,3 8,9 %	4,2 16,3 %	5,9 23,0 %
5	27,4 100 %	4,6 16,8 %	3,6 13,1 %	5,2 19,0 %	2,9 10,6 %	4,6 16,8 %	6,5 23,7 %
6	2,0 100 %						
7	1,3 100 %						

Abbildung 8 : KONZENTRATIONSVERLAUF VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 80 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN



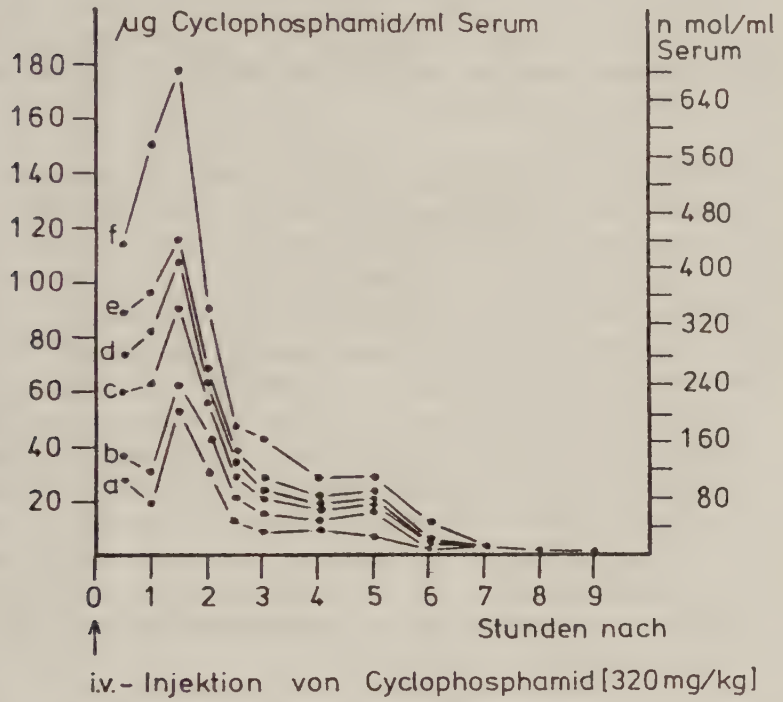
Legende :

f= Startlinienfraktion
e= Carboxyphosphamid
d= Aldophosphamid
c= 4-Hydroxy-Cyclophosphamid
b= 4-Keto-Cyclophosphamid
a= Cyclophosphamid

Tabelle 4 : DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 320 mg/kg BEIM KANINCHEN

ZEIT in h	GESAMT µg/ml	CYCLO-PHOSPHAMID	4-KETO-PHOSPHAMID	4-HYDROXY-PHOSPHAMID	ALDO-PHOSPHAMID	CARBOXY-PHOSPHAMID	STARTLINIEN FRAKTION
1/2	114,5	28,3	7,8	24,7	13,0	13,7	27,0
	100 %	24,8 %	6,8 %	21,7 %	11,3 %	12,0 %	23,6 %
1	150,3	19,5	11,0	33,2	17,6	13,7	55,3
	100 %	13,0 %	7,3 %	22,1 %	11,7 %	9,1 %	36,8 %
1 1/2	177,9	53,3	9,1	29,3	16,3	8,1	61,8
	100 %	30,0 %	5,1 %	16,5 %	9,2 %	4,6 %	34,7 %
2	90,5	31,9	13,0	11,7	6,5	4,6	22,8
	100 %	35,2 %	14,4 %	12,9 %	7,2 %	5,1 %	25,2 %
2 1/2	47,5	13,0	7,8	7,8	5,2	3,9	9,1
	100 %	27,4 %	16,4 %	16,4 %	12,4 %	8,2 %	19,2 %
3	42,5	8,5	7,2	5,2	3,3	3,3	15,0
	100 %	20,0 %	16,9 %	12,2 %	7,8 %	7,8 %	35,3 %
4	28,3	9,1	3,9	4,2	2,3	2,6	6,2
	100 %	32,2 %	13,8 %	14,8 %	8,1 %	9,2 %	21,9 %
5	28,8	7,5	8,5	3,6	2,0	2,0	5,2
	100 %	26,0 %	29,5 %	12,5 %	6,9 %	6,9 %	18,1 %
6	12,1	1,3	0,0	1,6	1,0	1,0	7,2
	100 %	10,7 %	0,0 %	13,2 %	8,3 %	8,3 %	59,5 %
7	3,3		8 h	2,0		9 h	1,3
	100 %			100 %			100 %

Abbildung 9 : KONZENTRATIONSVERLAUF VON CYCLOPHOSPHAMID UND SEINEN METABOLITEN IM SERUM NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 320 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN



Legende :

f= Startlinienfraktion
e= Carboxyphosphamid
d= Aldophosphamid
c= 4-Hydroxy-Cyclophosphamid
b= 4- Keto-Cyclophosphamid
a= Cyclophosphamid

In dieser Abbildung sind die Konzentrationsangaben gegenüber Abb. 7 und 8 optisch im Verhältnis 1:2 wiedergegeben.

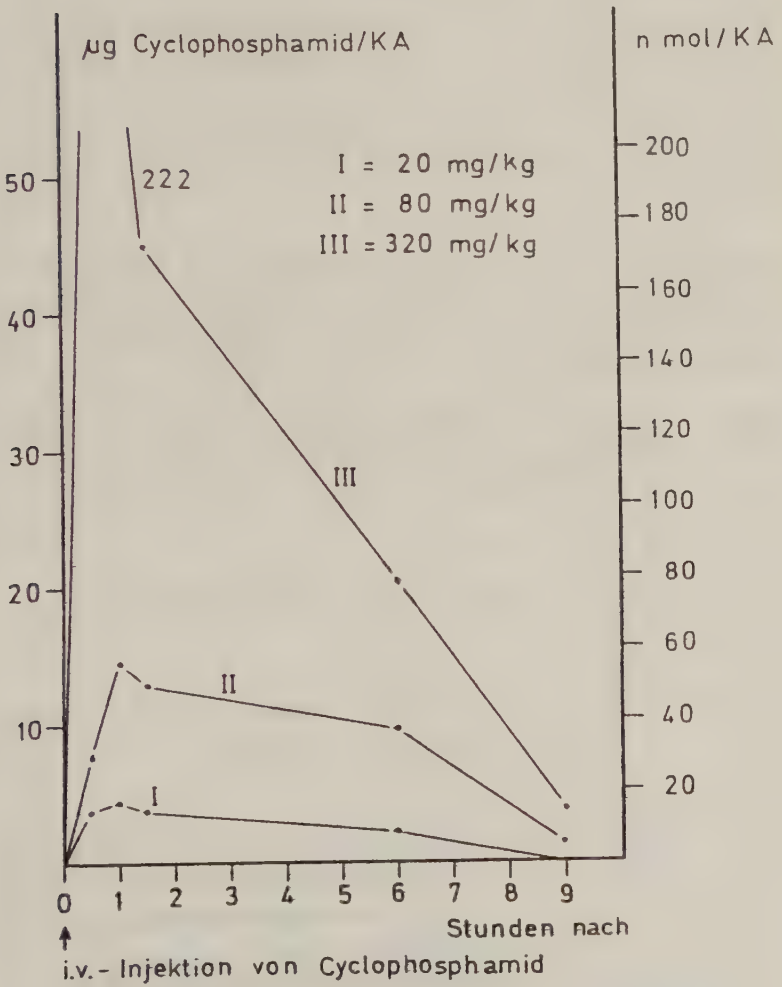
sich jedoch stark zu den beiden vorgenannten Dosen. Nach dem einzigen Konzentrationsgipfel bei 1 1/2 Stunden folgte ein rascher Konzentrationsabfall sowohl von unverändertem Cyclophosphamid als auch von seinen Metaboliten. Die mit dieser letalen Dosis behandelten Tiere zeigten bereits während des Versuches eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes und verstarben nach 14 bis 18 Stunden.

Die dünnschichtchromatographischen Bestimmungen von Cyclophosphamid im Keimanlagenmaterial nach intravenöser Applikation von 20, 80 und 320 mg/kg am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen sind in Tabelle 5 und die entsprechenden Konzentrationsverläufe in Abbildung 10 zusammengefaßt, nachdem keine der alkylierfähigen Metaboliten im Keimanlagenmaterial nachzuweisen waren. Während es bei den Dosen von 20 und 80 mg/kg Cyclophosphamid nur zu einem langsamen Anstieg von unverändertem Cyclophosphamid und einem nicht nennenswerten Konzentrationsgipfel nach 1 Stunde kam, wurde bei der Dosis von 320 mg/kg ein steiler Anstieg und ein außerordentlicher Konzentrationsgipfel nach 1 Stunde sowie ein rascher Abfall der Konzentration von unverändertem Cyclophosphamid beobachtet.

Tabelle 5 : DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CYCLOPHOSPHAMID IM KEIMANLAGENMATERIAL NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION

ZEIT in h	20 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID	80 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID	320 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID
1/2	3,8 µg	7,9 µg	192 µg
1	4,2 µg	14,6 µg	222 µg
1 1/2	3,9 µg	13,0 µg	44,9 µg
6	2,3 µg	9,8 µg	20,2 µg
9	0,0 µg	1,3 µg	4,9 µg/Keimanlage
24	0,0 µg	0,0 µg	0,0 µg (⊕ 18 h)

Abbildung 10 : KONZENTRATIONSVERLAUF VON CYCLOPHOSPHAMID IM KEIMANLAGENMATERIAL NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 20, 80 UND 320 mg/kg BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION



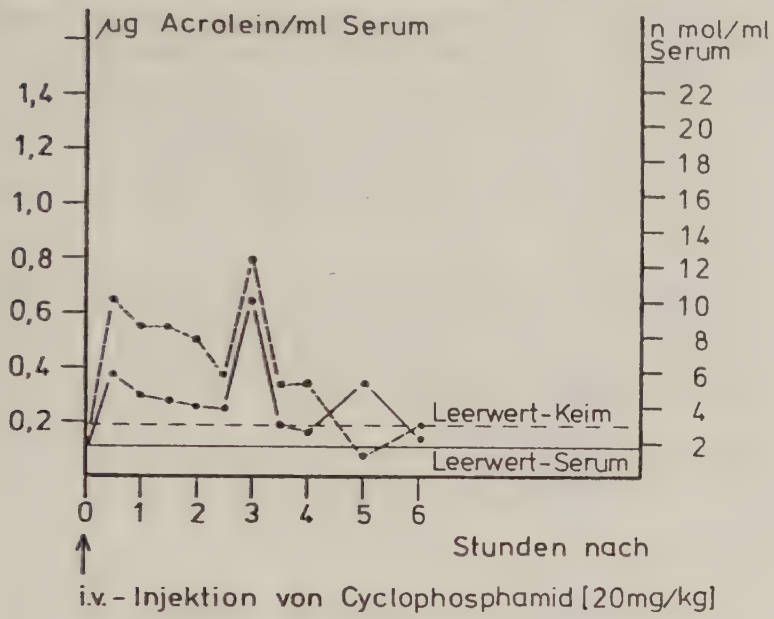
Die fluorimetrischen Bestimmungen von Acrolein im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit des Kaninchens am 9. Tag der Gestation nach Applikation von 20, 80 und 320 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht wurden zugleich am selben Tier vorgenommen (Tabellen 6, 7 und 8, Abbildungen 11, 12 und 13). Die Leerwerte im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit waren bei allen drei Tieren leicht verschieden. Die Leerwerte in der Dottersackflüssigkeit zeigten eine höhere Konzentration an fluorimetrisch erfaßten Substanzen.

Tabelle 6 : FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 20 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION

ZEIT in h	SERUM µg/ml	DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT µg/Keimanlage
Leer	0,11	0,19
1/2	0,38	0,65
1	0,30	0,55
1 1/2	0,28	0,55
2	0,26	0,50
2 1/2	0,25	0,37
3	0,65	0,8
3 1/2	0,19	0,34
4	0,17	0,36
5	0,35	0,07
6	0,14	0,19 µg entsprechender Acrolein-Konzentration

Bei Applikation von 20 mg/kg Cyclophosphamid ist der Konzentrationsverlauf von Acrolein im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit bei Abzug der

Abbildung 11 : KONZENTRATIONSVERLAUF DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 20 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9.TAG DER GESTATION



Legende : —— Konzentrationsverlauf im Serum
—— Konzentrationsverlauf im Keim

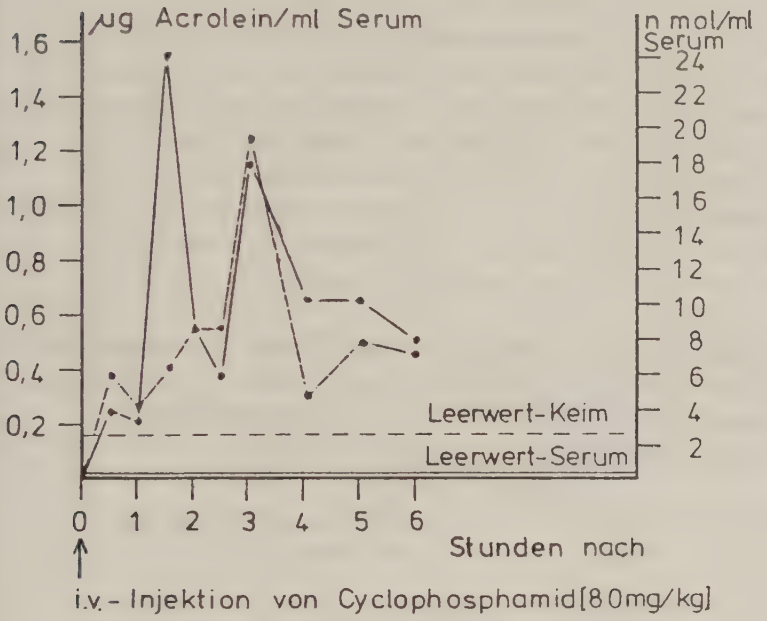
entsprechenden Leerwerte fast übereinstimmend (Tabelle 6, Abbildung 11). Nach einem raschen Anstieg bis zur ersten halben Stunde und einem langsamen Abfall folgte zur 3. Stunde ein Konzentrationsgipfel in beiden untersuchten Flüssigkeiten. Nur im mütterlichen Serum trat zur 5. Stunde noch eine kleine Konzentrationsspitze auf, bevor die Leerwertkonzentration in den untersuchten Flüssigkeiten in der 6. Stunde erreicht war.

Bei Applikation von 80 mg/kg Cyclophosphamid erschien nach 1 1/2 und 3 Stunden im mütterlichen Serum jeweils ein Konzentrationsgipfel von Acrolein, entsprechend den bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung aufgetretenen Konzentrationsmaxima von Cyclophosphamid und seinen alkylierfähigen Metaboliten. Dagegen konnte in der Dottersackflüssigkeit nur ein Konzentrationsgipfel von Acrolein nach der 3. Stunde beobachtet werden (Tabelle 7, Abbildung 12). Dieses Konzentrationsmaximum des Acroleins lag in beiden untersuchten Flüssigkeiten bei ca. 1,2 µg entsprechender Acrolein-Konzentration.

Tabelle 7 : FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 80 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION

ZEIT in h	SERUM µg/ml	DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT µg/Keimanlage
Leer	0,02	0,16
1/2	0,25	0,37
1	0,21	0,26
1 1/2	1,55	0,37
2	0,55	0,55
2 1/2	0,37	0,55
3	1,15	1,25
4	0,65	0,30
5	0,65	0,50
6	0,50	0,45 µg entsprechender Acrolein-Konzentration

Abbildung 12 : KONZENTRATIONSVERLAUF DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 80 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION



Legende : —— Konzentrationsverlauf im Serum
--- Konzentrationsverlauf im Keim

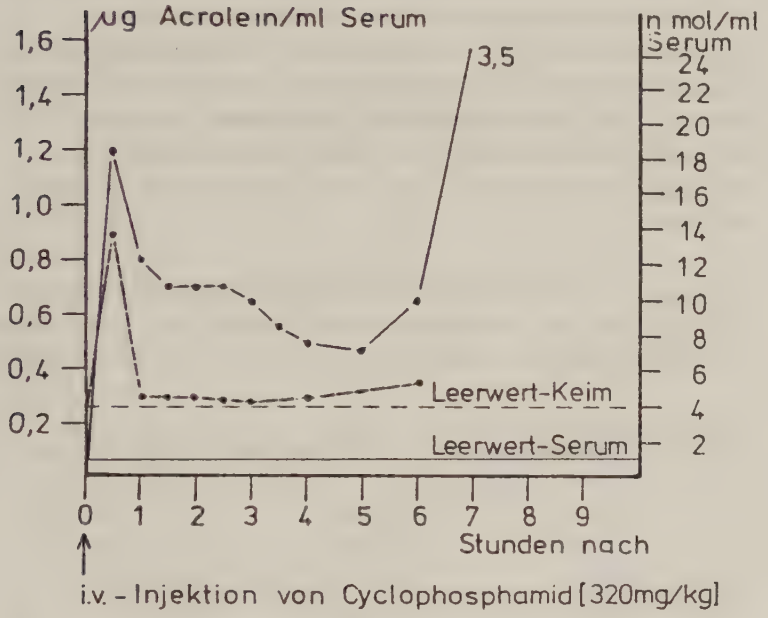
Dieses Tier und das mit 20 mg/kg Cyclophosphamid behandelte Tier verstarben nach der 6. Stunde wahrscheinlich an der Narkose, so daß hier ein gänzliches Absinken der Acrolein-Konzentrationen bis auf ihre Leerwerte nicht verfolgt werden konnte.

Bei Applikation von 320 mg/kg Cyclophosphamid kam es sowohl im mütterlichen Serum als auch in der Dottersackflüssigkeit nach einer halben Stunde bereits zu einem leichten Konzentrationsgipfel (Tabelle 8, Abbildung 13). Während die Acrolein-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit nach der 1. Stunde auf etwa die Leerwertkonzentration abfiel und sich von da ab kaum noch änderte, nahm die Acrolein-Konzentration im mütterlichen Serum einen fast muldenförmigen Verlauf um dann präfinal auf einen Wert von 3,5 µg entsprechender Acrolein-Konzentration wieder stark anzusteigen. Dieses Tier verstarb kurz vor der 7. Stunde nach Cyclophosphamid-Applikation wahrscheinlich an der hohen Dosis und der Narkose.

Tabelle 8 : FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 320 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION

ZEIT in h	SERUM µg/ml	DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT µg/Keimanlage
Leer	0,07	0,26
1/2	1,2	0,9
1	0,8	0,30
1 1/2	0,7	0,30
2	0,7	0,30
2 1/2	0,7	/
3	0,65	0,29
3 1/2	0,55	/
4	0,50	0,30
5	0,47	/
6	0,65	0,35 µg entsprechender
7	3,5	Acrolein-Konzentration

Abbildung 13 : KONZENTRATIONSVERLAUF DES ACROLEINS IM SERUM UND IN DER DOTTERSACKFLÜSSIGKEIT NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON 320 mg/kg CYCLOPHOSPHAMID BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION



Legende : —— Konzentrationsverlauf im Serum
--- Konzentrationsverlauf im Keim

5.2 Ergebnisse nach Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Keimanlagenmaterial nach Applikation von Cyclophosphamid in den Dottersack des Kaninchens am 9. Tag der Gestation

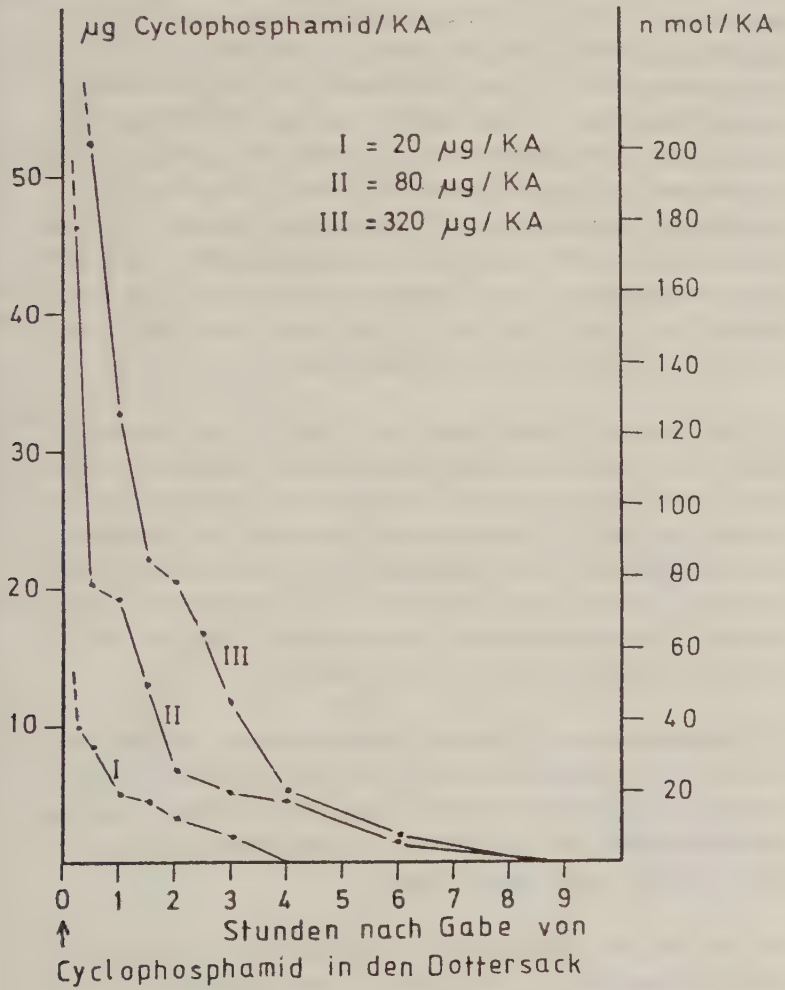
Nach Injektion drei verschiedener Dosen Cyclophosphamid in den Dottersack konnte bei Bestimmungen über 9 Stunden lediglich unverändertes Cyclophosphamid im Keimanlagenmaterial wiedergefunden und hierin verfolgt werden. Eine fluorimetrische Bestimmung des Acroleins wurde nicht durchgeführt, da keine beim Abbau von Cyclophosphamid zuerst gebildeten Metabolite nachweisbar waren.

Tabelle 9 : DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CYCLOPHOSPHAMID IM KEIMANLAGENMATERIAL NACH APPLIKATION IN DEN DOTTERSACK DES KANINCHENS AM 9. TAG DER GESTATION

ZEIT in h	20 µg/KA CYCLOPHOSPHAMID	80 µg/KA CYCLOPHOSPHAMID	320 µg/KA CYCLOPHOSPHAMID
1/4	10,1 µg	46,2 µg	62,4 µg
1/2	8,5 µg	21,5 µg	52,3 µg
1	5,2 µg	19,5 µg	32,5 µg
1 1/2	4,6 µg	13,0 µg	22,1 µg
2	3,3 µg	6,8 µg	20,5 µg
2 1/2	/	/	16,9 µg
3	2,0 µg	5,2 µg	11,7 µg
4	0,0 µg	4,6 µg	5,2 µg
6	0,0 µg	1,6 µg	2,0 µg
9	0,0 µg	0,0 µg	0,0 µg/Keimanlage

In der Tabelle 9 und der Abbildung 14 ist zu erkennen, daß der Konzentrationsabfall bzw. die Diffusion von unverändertem Cyclophosphamid aus der Keimanlage einen exponentiellen Verlauf nimmt. Bereits nach einer Viertelstunde nach Applikation von 20 und 80 µg/Keimanlage waren etwa die Hälfte und nach Applikation von

Abbildung 14 : KONZENTRATIONSVERLAUF VON CYCLOPHOSPHAMID IM KEIMANLAGENMATERIAL NACH APPLIKATION VON 20, 80 UND 320 µg IN DEN DOTTERSACK BEIM KANINCHEN AM 9. TAG DER GESTATION



320 µg/Keimanlage nur noch 1/5 der Initialkonzentration vorhanden. Bis zur 4. Stunde nach Applikation von 20 µg/ Keimanlage und bis zur 9. Stunde nach Applikation von 80 und 320 µg/Keimanlage fielen die Konzentrationen auf die Nachweisbarkeitsgrenze ab.

5.3 Ergebnisse nach Testung von Cyclophosphamid auf Embryotoxizität mit der Dottersackmethode

Zur Testung von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode wurden drei Versuchsserien aufgestellt. In den Serien wurden 20 (I), 80 (II) und 320 (III) µg Cyclophosphamid in den Dottersack der Keimanlagen eines Uterushornes injiziert, in den Dottersack der Keimanlagen der anderen Seite wurde die gleiche Flüssigkeitsmenge physiologischer Kochsalzlösung zur Kontrolle eingebracht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt. Die gefundenen Mißbildungen und Retardierungszeichen wurden im einzelnen in der Tabelle 11 den jeweiligen Serienversuchs- und Kontrollseiten zugeordnet.

In der Serie I (Injektion von 20 µg Cyclophosphamid) kamen 15 Muttertiere mit ihren Keimanlagen zur Auswertung. Auf der Versuchsseite waren bei 64 Implantationen 4 Resorptionen zu verzeichnen. Von den 60 lebenden Feten zeigten 3 Mißbildungen und einer Retardierungszeichen. Auf der Kontrollseite waren bei 55 Implantationen 2 Resorptionen zu registrieren. Von den 53 lebenden Feten trugen 2 Mißbildungen.

Die Unterschiede in den Resorptionsraten (6,3 % Versuchsseite, 3,6 % Kontrollseite) und in den Mißbildungsfrequenzen (5,0 % Versuchsseite, 3,8 % Kontrollseite) erwiesen sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als nicht signifikant.

Die Feten der Versuchsseite hatten ein Durchschnittsgewicht von 34,9 g und eine mittlere Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 8,6 cm, während die Feten der Kontrollseite durchschnittlich 35,5 g wogen und im Mittel 8,7 cm maßen. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant (p= 0,01).

Tabelle 10 : ERGEBNISSE NACH APPLIKATION VON CYCLOPHOSPHAMID IN DEN DOTTERSACK DES KANINCHENS AM 9. TAG DER GESTATION

	SERIE I		SERIE II		SERIE III	
	20 ug CP in 0,01 ml 0,9 % NaCl	Kontrolle 0,01 ml 0,9 % NaCl	80 ug CP in 0,01 ml 0,9 % NaCl	Kontrolle 0,01 ml 0,9 % NaCl	320 ug CP in 0,02 ml 0,9 % NaCl	Kontrolle 0,02 ml 0,9 % NaCl
Anzahl der Muttertiere	15		12		15	
Anzahl der Implantationen	64	55	47	49	50	45
Anzahl (%) der Resorptionen	4 (6,3)	2 (3,6)	3 (6,4)	5 (10,2)	3 (6,0)	3 (6,5)
Anzahl der Feten	60	53	44	44	47	42
Anzahl (%) der Mißgebildeten	3 (5,0)	2 (3,8)	2 (4,5)	2 (4,5)	1 (2,1)	2 (4,8)
Anzahl (%) der Retardierten	1 (1,7)	0 (0,0)	3 (6,8)	2 (4,5)	3 (6,4)	3 (7,1)
Gewicht der Feten in g	34,9(±6,3)	35,5(±4,7)	33,7(±6,1)	35,2(±5,6)	34,9(±5,5)	36,6(±5,3)
SSL der Feten in cm	8,6(±0,5)	8,7(±0,6)	8,7(±0,6)	8,8(±0,5)	8,7(±0,5)	8,8(±0,5)

In der Serie II (Injektion von 80 µg Cyclophosphamid) zeigten 3 operierte Muttertiere bei der Sektion pathologische Veränderungen, so daß ihre Feten nicht in die Statistik aufgenommen wurden. 12 gemäß der Dottersackmethode behandelte Muttertiere dieser Serie waren gesund. Auf der Versuchsseite wurden bei 47 Implantationen 3 Resorptionen festgestellt. Von den 44 lebenden Feten waren 2 mißgebildet und 3 retardiert entwickelt. Die Kontrollseite brachte bei 49 Implantationen 5 Resorptionen und 44 lebende Feten, von denen 2 mißgebildet waren und 2 Retardierungszeichen aufwiesen.

Die Unterschiede in den Resorptionsraten (6,4 % Versuchsseite, 10,2 % Kontrollseite) und in den Mißbildungsfrequenzen (4,5 % Versuchsseite, 4,5 % Kontrollseite) waren nicht signifikant (p= 0,05).

Ein Durchschnittsgewicht von 33,7 g bei einer mittleren SSL von 8,7 cm auf der Versuchsseite stand einem Durchschnittsgewicht von 35,2 g bei einer mittleren SSL von 8,8 cm auf der Kontrollseite gegenüber. Der Unterschied war nicht signifikant (p= 0,01).

In der Serie III (Injektion von 320 µg Cyclophosphamid) waren 15 Muttertiere mit ihren Keimanlagen auswertbar. Auf der Versuchsseite wurden bei 50 Implantationen 3 Resorptionen beobachtet. Von den 47 Feten waren einer mißgebildet und 3 retardiert entwickelt. Auf der Kontrollseite wurden bei 45 Implantationen 3 Resorptionen gezählt. Von den 42 lebenden Feten zeigten 2 Mißbildungen und 3 wiesen Retardierungszeichen auf.

Die Unterschiede in den Resorptionsraten (6,0 % Versuchsseite, 6,5 % Kontrollseite) und in den Mißbildungsfrequenzen (2,1 % Versuchsseite, 4,8 % Kontrollseite) zeigten keine Signifikanz (p= 0,05).

Tabelle 11 : HÄUFIGKEIT DER MIßBILDUNGEN UND RETARDIERUNGSZEICHEN NACH APPLIKATION VON 20, 80 UND 320 ug CYCLOPHOSPHAMID IN DEN DOTTERSACK DES KANINCHENS AM 9. TAG DER GESTATION

MIßBILDUNGEN + RETARDIERUNGEN IM BEREICH DER	SERIE I				SERIE II				SERIE III			
	20 µg CP/KA		Kontrolle		80 µg CP/KA		Kontrolle		320 µg CP/KA		Kontrolle	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
W	2	1	1					1	1	3	1	3
St						2		1				
W, R	1		1									
W, St					2	1	1					
Spina bifida aperta							1					
ZAHL DER FETEN	3M	1R	2M		2M	3R	2M	2R	1M	3R	1M	3R

Legende: Fehlbildungen im Bereich der Wirbelsäule = W
der Rippen = R
des Sternum = St

M = Mißbildungen, R = Retardierungen

Das Durchschnittsgewicht von 34,9 g bei einer mittleren SSL von 8,7 cm auf der Versuchsseite und der Durchschnittswert von 36,6 g bei einer mittleren SSL von 8,8 cm ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (p=0,01).

Die beobachteten Mißbildungen und Retardierungszeichen waren Fehlbildungen im Bereich der Wirbelsäule, des Sternums und der Rippen. Einige Mißbildungen und Retardierungszeichen traten kombiniert auf (Tabelle 11). Ein Fet mit einer Spina bifida aperta wurde auf der Kontrollseite der Serie II beobachtet.

6. D I S K U S S I O N

6.1 Cyclophosphamid und seine Metabolite im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial beim Kaninchen

Durch dünnschichtchromatographische und fluorimetrische Untersuchungen beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation konnten Cyclophosphamid und seine bekannten Metabolite, das sind 4-Keto-Cyclophosphamid, 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, Aldophosphamid, Carboxyphosphamid, die Friedmansäure und weitere alkylierfähige Abbauprodukte sowie das Acrolein, getrennt im mütterlichen Serum qualitativ und auch quantitativ erfaßt und ihr Konzentrationsverlauf über den meßbaren Zeitraum verfolgt werden.

Mehrere Trennungsmethoden waren zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Cyclophosphamid von einigen Autoren beschrieben worden.

HOHORST, ZIEMANN und BROCK (1965) versuchten alkylierende Substanzen im Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid durch Papierchromatographie nachzuweisen. Sie erhielten 3 Fraktionen alkylierender Aktivität.

DOLD und GÄRTNER (1972) führten Untersuchungen über die Pharmakokinetik von Cyclophosphamid bei Mensch und Kaninchen durch. Nach intravenöser Injektion wurde Blut und Urin, teilweise auch Galle papierchromatographisch und elektrophoretisch untersucht. Hierbei wurden regelmäßig 3, maximal 7 Cyclophosphamid- Metabolite identifiziert.

Ein Nachteil der Papierchromatographie besteht darin, daß die zu untersuchenden Mengen gering sind. Die Sichtbarmachung der alkylierenden sowie der nach Hydrolyse alkylierfähigen Metaboliten geschah bei den meisten Untersuchungen mit dem NBP-Reagenz (4-p-nitrobenzyl-Pyridin) nach FRIEDMAN und BOGER (1961).

Ein anderes Reagenz, das PHB (4-pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolhydrazon) verwendeten NORPOTH, ADDICKS und WITTIG (1975) bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen auf Kieselgelplatten. Der Vorteil des PHB gegenüber dem NBP liegt in der Farbstabilität und der besseren Dokumentierbarkeit auf der DC-Platte. Ein erheblicher Nachteil des PHB gegenüber dem NBP liegt jedoch darin, daß das PHB nicht wie das NBP eine lineare Extinktionskurve liefert.

VOELCKER, DRAEGER, PETER und HOHORST (1974) entwickelten mit der Dünnschichtchromatographie auf Propandiol-(1,3) imprägnierten Zelluloseplatten die wohl zur Zeit beste Methode zur Trennung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten. Obwohl dieses Verfahren sich recht kompliziert zeigt, bietet es aber eine ausreichende Trennschärfe für den Nachweis der wichtigsten Metaboliten. Die mit dieser Methode erfaßten Substanzen waren Cyclophosphamid, 4-Keto-Cyclophosphamid, 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, Aldophosphamid, Carboxyphosphamid und die alkylierfähigen Metabolite der Startlinienfraktion, von denen die Friedmansäure als die wichtigste Substanz zu nennen ist. Über die anderen Bestandteile dieser Fraktion besteht noch Unklarheit.

Nach dieser Methode wurde auch in diesen vorliegenden Untersuchungen verfahren. Die Gesamtmenge an chromatographierbarer Substanz beläuft sich bei diesem Verfahren bezogen auf eine Chromatographieplatte auf maximal

5 µMol Cyclophosphamid, das sind ungefähr 1000 µg, also 1 mg. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 nMol, dies entspricht ungefähr 0,3 µg Cyclophosphamid.

Bei der Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum erfolgten die ersten Untersuchungen bei allen drei Dosierungen 1/2 Stunde nach der intravenösen Applikation. Untersuchungen zu einem noch früheren Zeitpunkt waren beim Kaninchen schon von anderen Autoren beschrieben worden. GAERTNER (1971) berichtete, daß kurze Zeit nach Cyclophosphamid-Injektion (ca. 8 Minuten) beim Kaninchen die höchste Konzentration von unverändertem Cyclophosphamid im Blut zu messen war. KLINKE, LISS und PALME (1964) fanden beim Kaninchen nach 10 Minuten nur noch 5 % der injizierten Cyclophosphamid-Menge im Blut wieder. Die Menge an Umwandlungsprodukten gaben sie zu diesem Zeitpunkt ebenfalls mit 5 % an. Beide Untersuchungen beschrieben einen schnellen Einstrom von Cyclophosphamid in die Gewebe und einen danach allmählich beginnenden Rückstrom ins Blut.

Während des weiteren Konzentrationsverlaufes war bei allen drei Dosen bemerkenswert, daß Cyclophosphamid in unverändertem Zustand meist in höherer Konzentration als seine Metabolite im mütterlichen Serum vorlag. Die Gesamtkonzentrationsgipfel, die auf einen Anstieg von unverändertem Cyclophosphamid zurückzuführen sind und einen relativen Anstieg der Metaboliten-Konzentration zur Folge hatten, sind mit der Kumulation von aus den Geweben zurückströmendem und im Blut verbliebenem Cyclophosphamid zu erklären. Bei Applikation von 20 mg/kg Cyclophosphamid traten nach 1, 1/2 und 3 Stunden jeweils ein Konzentrationsgipfel auf. Bei der Dosis von 80 mg/kg wurden nach 1, 2 und 3 Stunden je ein Maximum an

unverändertem Cyclophosphamid beobachtet. Wieso es bei der sehr hohen Dosis von 320 mg/kg Cyclophosphamid jedoch nur zu einem steilen Anstieg mit einem Konzentrationsgipfel und zu keinen weiteren Spitzen kam, bleibt ungeklärt.

Andere pharmakokinetische Untersuchungen am Kaninchen über Resorption und Verteilung von Cyclophosphamid in den Geweben und Elimination durch Galle, Harn und Stuhl wurden bereits von KLINKE, LISS und PALME (1964) KLINKE (1969), BORIES, RENERRE und ROUGEOT (1970), GAERTNER (1971) und DOLD und GAERTNER (1972) beschrieben.

Der mit der dünnschichtchromatographischen Methode nicht zu erfassende Metabolit, das Acrolein, wurde durch eine in der Ausführung abgewandelte fluorimetrische Methode nach ALARCON (1968) bestimmt. Mit der zu dieser Bestimmung benötigten Substanz, dem m-Aminophenol können auch andere Substanzen mit einer Aldehydfunktion und einer Doppelbindung reagieren und somit die Acroleinmessung beeinflussen. Außerdem ist Acrolein ein sich leicht verflüchtigender Stoff, so daß trotz sorgfältiger Handhabung der Proben ein Konzentrationsverlust nicht ausgeschlossen wird . Ferner konnten wegen der begrenzten Anzahl von Keimanlagen pro Muttertier Leerwertbestimmungen nicht in ausreichender Zahl durchgeführt werden.

Bei der Bestimmung von Acrolein konnte nur nach Applikation von 80 mg/kg Cyclophosphamid etwa zur gleichen Zeit wie bei den dünnschichtchromatographischen Bestimmungen von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Serum zwei Konzentrationsgipfel beobachtet werden. Bei der Dosis von 20 mg/kg Cyclophosphamid entsprach nur eine Konzentrationsspitze von Acrolein (3-Stunden-Wert) einem Konzentrationsmaximum von Cyclophosphamid

und seinen alkylierfähigen Metaboliten. Nach Applikation der sehr hohen Dosis von 320 mg/kg Cyclophosphamid kam es nach 1/2 Stunde zu einer Spitze und danach zu einem leichten kontinuierlichen Abfall der Acrolein-Konzentration, die dann präfinal einen außerordentlich hohen Anstieg nahm. Diese recht eigenwilligen Konzentrationsverläufe des Acroleins sind vorwiegend darauf zurückzuführen, daß Acrolein ein sehr reaktiver Stoff ist und schnell Verbindungen eingeht, weshalb er dann nicht mehr nachweisbar ist.

ALARCON und MEIENHOFER (1971) hielten Acrolein als Abbauprodukt des Cyclophosphamids wegen seiner Zytotoxizität und seiner Reaktionsfähigkeit für die tumorhemmende Wirkung als die entscheidende Komponente.

Es ist anzunehmen, daß das Acrolein bereits im Blut und in anderen Geweben mit Proteinen und anderen Stoffen eine Verbindung eingeht und es so zu diesen Konzentrationsverläufen kommt. Andererseits sind die Konzentrationsverläufe von Acrolein in der Dottersackflüssigkeit denen im mütterlichen Serum gemessenen Werten ähnlich.

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung im Keimanlagenmaterial bzw. der fluorimetrischen Acrolein-Bestimmung in der Dottersackflüssigkeit konnten nach intravenöser Applikation von 20, 80 und 320 mg/kg Cyclophosphamid beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation innerhalb des Nachweisbarkeitsbereiches dieser Methoden lediglich Cyclophosphamid als unveränderte Substanz und sein Metabolit Acrolein nachgewiesen werden. Während die Cyclophosphamid-Konzentration in dem Keimanlagenmaterial im Gegensatz zum mütterlichen Serum nach Applikation von 20 und 80 mg/kg beim Muttertier bis zur 1. Stunde anstieg um dann

langsam abzufallen, richtete sich die Acrolein-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit bei diesen Dosen ungefähr nach der Acrolein-Konzentration im mütterlichen Serum. Bei der dem Muttertier verabreichten Dosis von 32o mg/kg Cyclophosphamid kam es im Keimanlagenmaterial zu einem außerordentlichen Einstrom von unverändertem Cyclophosphamid. Die Acrolein-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit hingegen fiel bei dieser Dosis nach einem kurzen Anstieg bei einer halben Stunde wieder zurück auf den Leerwertbereich.

Nach Injektion von Cyclophosphamid in den Dottersack konnte im Keimanlagenmaterial kein messbarer Metabolismus festgestellt werden. Der rasche exponentielle Abfall der Konzentrationen unveränderten Cyclophosphamids bei allen drei Dosen ist als Zeichen dafür zu werten, daß Cyclophosphamid gut die Dottersackwand passieren kann. Eine Metabolisation im mütterlichen Organismus von Cyclophosphamid, das aus der Keimanlage stammt, würde wegen einer zu niedrigen Konzentration keine messbaren Ergebnisse weder von Acrolein in der Dottersackflüssigkeit noch von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum liefern.

6.2 Embryotoxizität von Cyclophosphamid nach Testung mit der Dottersackmethode

Bei der direkten Applikation von Cyclophosphamid mit der Dottersackmethode ging aus den Untersuchungen hervor, daß unverändertes Cyclophosphamid in Dosen von 20, 80 und 320 µg/Keimanlage im Vergleich zur Lösungskontrolle bei demselben Muttertier weder embryoletal noch teratogen wirkt. Die Unterschiede in allen drei Versuchsserien erwiesen sich gegenüber den Kontrollserien als nicht signifikant.

Die Mißbildungsfrequenz und die Resorptionsrate lagen in allen drei Serien trotz der vorausgegangenen Operation außerordentlich niedrig. Die Mißbildungsfrequenz in dieser teratologischen Untersuchung bewegte sich in dem Bereich von 2,1 bis 5,0 %. Die Resorptionsrate schwankte zwischen 3,6 und 10,2 %.

Verglichen mit den Kontrollserien der Untersuchungen mit der Dottersackmethode von CLAUSSEN und BROEDERSDORFF (1974) und CLAUSSEN und BREUER (1975) sind die Mißbildungsfrequenzen und Resorptionsraten auf den Versuchs- und Kontrollseiten der Serien I, II und III wesentlich niedriger. In den Untersuchungen von CLAUSSEN und BROEDERSDORFF war bei den Kontrolltieren die Mißbildungsfrequenz 32 % und die Resorptionsrate 50 %. CLAUSSEN und BREUER ermittelten in den Kontrolluntersuchungen dreier Serien eine Mißbildungsfrequenz von 24,2 %, 18,1 % und 16,7 %. Die Resorptionsrate in den drei Kontrollserien lag bei 19,4 %, 21,7 % und 29,9 %.

WAGNER (1972) ermittelte für Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer derselben Zucht an einer Stichprobe von 10 Kaninchen eine spontane Mißbildungsfrequenz von 3,4 % und eine Resorptionsrate von 5,4 %.

So ist mit der vorliegenden teratologischen Untersuchung das Ziel der Dottersackmethode erreicht, trotz des Einflusses einer Manipulation an den Keimanlagen, eines Operationsstresses des Muttertieres und einer Äther-Narkose auf der Kontrollseite direkt vergleichbare Ergebnisse zu konventionellen Applikationsformen in der Teratologie zu entwickeln.

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gefundenen nicht embryotoxischen Wirkung von unverändertem Cyclophos-

phamid beschrieben GERLINGER, RUCH, COURRIER und CLAVERT (1962) und SINGH, TULI und GUPTA (1971) bei vergleichbaren Untersuchungen am Hühnchenkeim erhöhte Resorptions- und Mißbildungsraten. Bei der langen Verweildauer von Cyclophosphamid im Hühnerei ist es denkbar, daß Cyclophosphamid spontan oder enzymatisch aktiviert wird und danach erst embryoletal oder teratogen auf das Hühnchenembryo wirkt. Außerdem wird die Natur dem Hühnchenkeim, der stoffwechselmäßig auf sich allein gestellt ist, eine größere Quantität von Enzymen wie etwa die Zytochrom-P-450-oxidase überlassen haben als dem vom Muttertier gut versorgten Säugerembryo.

GIBSON und BECKER (1971) fanden bei Hemmung des Metabolismus von Cyclophosphamid in der Leber schwangerer Swiss-Webster-Mäuse und einer damit einhergehenden Verminderung der Metabolitenmenge eine Steigerung der embryotoxischen Wirkung. Die Autoren schlossen daraus, daß der embryotoxische Effekt eher unverändertem Cyclophosphamid zuzuschreiben sei. Die vorliegenden Untersuchungen mit der Dottersackmethode, sowohl die dünnschichtchromatographischen Bestimmungen im Keimanlagenmaterial nach Injektion von Cyclophosphamid in den Dottersack als auch die teratologischen Versuche, haben gezeigt, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit Cyclophosphamid selbst beim Kaninchenembryo nicht metabolisiert wird und auch in hohen Dosen keine embryotoxischen Schäden setzt.

Zusammengefaßt können aus der vorliegenden Arbeit folgende Schlüsse gezogen werden:
1. Lediglich Cyclophosphamid und einer seiner Metabolite, das Acrolein, können im Keimanlagenmaterial bzw. in der Dottersackflüssigkeit nachgewiesen werden. Andere Metabolite des Cyclophosphamids können vermutlich nicht die Dottersackwand passieren.

2. Unverändertes Cyclophosphamid wird mit größter Wahrscheinlichkeit nicht im Keim metabolisiert.
3. Unverändertes Cyclophosphamid wirkt dem Säugerembryo direkt verabreicht nicht embryotoxisch. Es bleibt die Frage, auf welche Weise Cyclophosphamid nach Applikation beim Muttertier seine Embryotoxizität entfaltet.

6.3 Mögliche embryotoxische Wirkmechanismen von Cyclophosphamid

Für die embryotoxische und teratogene Wirkung von Cyclophosphamid ist unverändertes Cyclophosphamid als ursächlicher Faktor mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Die folglich dieser Untersuchung einzige Substanz, die außer unverändertem Cyclophosphamid in die Keimanlagen vorzudringen vermag, ist das Acrolein.

ALARCON und MEIENHOFER (1971) hatten das Acrolein als eine stark zytotoxische und reaktionsfähige Substanz bezeichnet, dem sie auch die maßgebliche zytostatische Wirkung von Cyclophosphamid zuschrieben.

MUNSCH, DE RECONDO und FRAYSSINET (1973) stellten anhand von in-vitro-Versuchen fest, daß Acrolein durch Hemmung der DNA- und RNA-Synthese als auch durch Bindung an die DNA das Zellwachstum hemmt.

So könnte man vermuten, daß der embryotoxische Effekt des Cyclophosphamids von Acrolein abhängig ist. Während in der vorliegenden Untersuchung bei Applikation von 20 und 80 mg/kg Cyclophosphamid beim Muttertier eine Steigerung der Acrolein-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit beobachtet werden konnte, lag bei Applikation von 320 mg/kg Cyclophosphamid die

Acrolein-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit relativ niedrig. Dies könnte durch eine mögliche Schädigung der Dottersackwand durch die alkylierenden Metabolite verursacht sein, so daß die Passage für Acrolein gehindert wird. So wäre es demnach möglich, das hier relativ weniger Mißbildungen zu erwarten wären. Die verabreichte Dosis ist aber für das Muttertier in jedem Fall letal und es ist auf diesem Wege kein Nachweis für diese These zu erbringen.

Von den übrigen Metaboliten (4-Keto-Cyclophosphamid, 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, Aldophosphamid, Carboxyphosphamid, die Friedmansäure und andere Metaboliten der Startlinienfraktion) ist nach den vorliegenden Untersuchungen am 9. Tag der Gestation keine direkte embryotoxische Wirkung auf den Keim zu erwarten. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß noch unbekannte, nicht alkylierfähige Metaboliten des Cyclophosphamids in die Keimanlage einzudringen vermögen. Ferner ist eine Veränderung der Nahrungsstoffe durch die Metabolite des Cyclophosphamids im mütterlichen Blut denkbar, die der Embryo über eine Passage der Dottersackwand erhält.

Ein anderer möglicher Wirkmechanismus wäre in einer Schädigung der Dottersackwand bzw. der Plazenta durch die alkylierenden Metabolite zu sehen. Hierdurch könnte es zu einer qualitativen und/oder quantitativen Veränderung der Passage von Substanzen kommen, die der Keim für seine regelrechte Entwicklung benötigt. Ebenso könnten ausscheidungspflichtige Stoffe zurückgehalten werden und in der Keimanlage verbleiben. Hierbei würde es sich um einen indirekten Wirkungsmechanismus handeln.

Schließlich muß als Ursache für die bekannte Embryotoxizität von Cyclophosphamid ein kompliziertes Zusammenspiel mehrerer der hier aufgeführten Faktoren genannt werden. Zur Aufklärung des embryotoxischen Wirkprinzips von Cyclophosphamid sind somit weitere Untersuchungen notwendig, in dem die übrigen Wirkmechanismen in ihrer Bedeutung für die embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid getestet werden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen dürften Untersuchungen zur Embryotoxizität von Acrolein und die Klärung einer möglichen schädigenden Wirkung der Metabolite des Cyclophosphamids auf die Dottersackwand von besonderem Interesse sein.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Am 9. Tag der Gestation wurden Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer drei verschiedene Dosen von Cyclophosphamid (20, 80 und 320 mg/kg Körpergewicht) intravenös injiziert. Zu bestimmten Zeiten (1/2, 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 Stunden) nach Cyclophosphamid-Injektion wurde die Konzentration von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im mütterlichen Serum und im Keimanlagenmaterial dünnschichtchromatographisch in Zusammenhang mit dem NBP-Test nach FRIEDMAN und BOGER (1961) bestimmt (VOELCKER et al., 1974). Acrolein wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer gemessen (ALARCON, 1968). Cyclophosphamid und seine Metaboliten 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, 4-Keto-Cyclophosphamid, Aldophosphamid, Carboxyphosphamid, die Friedmansäure und Acrolein zeigten sich im mütterlichen Serum. Dagegen konnten nur Cyclophosphamid und Acrolein im Keimanlagenmaterial nachgewiesen werden.

Nach Injektion von 20, 80 und 320 µg Cyclophosphamid pro Keimanlage direkt in den Dottersack waren außer Cyclophosphamid keine Metabolite im Keimanlagenmaterial messbar.

Ferner wurde unverändertes Cyclophosphamid auf seine embryotoxische Wirkung mit der Dottersackmethode untersucht (CLAUSSEN und BROEDERSDORFF, 1974). Hierzu wurden die Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer am 9. Tag der Gestation während einer Äther-Sauerstoff-Narkose laparotomiert. Drei verschiedene Dosen Cyclophosphamid (20 und 80 µg/Keimanlage auf 0,01 ml bzw. 320 µg/Keimanlage auf 0,02 ml physiologische Kochsalzlösung) wurden in den Dottersack der Keimanlagen eines Hornes des Uterus bicornis injiziert und die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung zur Kontrolle in die Keimanlagen des anderen Hornes. Am 28. Tag der

Gestation wurden die Kaninchen getötet, die Uteri entnommen, die Resorptionen gezählt und die Feten auf Mißbildungen untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle fanden sich nach Cyclophosphamid-Injektion keine erhöhten Resorptions- und Mißbildungsraten. Mögliche Ursachen der embryotoxischen Wirkung von Cyclophosphamid wurden diskutiert.

8. L I T E R A T U R

ALARCON, R.A.: Fluorimetric Determination of Acrolein and Related Compounds with m-Aminophenol. Analytical Chemistry 40: 1704-1708 (1968)

ALARCON, R.A. and J. MEIENHOFER: Formation of the cytotoxic Aldehyde Acrolein during in Vitro Degradation of Cyclophosphamide. Nat. New Biol. 233: 250-252 (1971)

ANGEL, H.: Über die Wirkung des Triäthyleniminobenzochinon-1,4 (Trenimon) und des N,N-bis-(ß-Chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureesterdiamid (Endoxan^{R}) auf den Schwangerschaftsverlauf, die Embryonalentwicklung, die Fertilität und die Mutagenität an dem Rattenstamm BDI. Inaug.-Diss. Univ. des Saarlandes, Homburg/Saar

ARNOLD, H. und F. BOURSEAUX: Synthese und Aufbau cytostatisch wirksamer zyklischer N-Phosphamidester des Bis-(ß-chloräthyl)amins. Angew. Chem. 70: 539-544 (1958)

ARNOLD, H, F. BOURSEAUX und N. BROCK: Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester. Naturwiss. 45: 64-66 (1958)

BACK, N., T.J. BARDOS, Z.F. CHMIELEWICZ, E. ACHTER and A.E. MUNSON: Studies on the Effect of Cyclophosphamide and AB 132 by Using Radioprotectiv Substances. Life Sciences 3: 803-808 (1965)

BELOHORSKY, B., J. SIRACKY, L. SANDOR and E. KLAUBER: Comments on the Development of Amenorrhea Caused by Myleran in Cases of Chronic Myelosis. Neoplasma 7: 397 (1960)

BERENBLUM,I.: The Modifying Influence of Dichlorethyl-sulphide on the Induction of Tumors in Mice by tar.
J. of Path. Bact. 32: 425-434 (1929)

BERENBLUM, I.: Experimental Inhibition of Tumour Induction by Mustard gas and other Compounds.
J. Path. Bact 40: 549-558 (1935)

BERENBLUM, I.: The Anti-carcinigenic Action of Dichloro-diethylsulphide (Mustard gas).
J. Path. Bact. 34: 731-745 (1931)

BERENBLUM, I., L.P. KENDAL and J.W. ORR: Tumour Metabolism in the Presence of Anti-carcinogenic Substances.
Biochem. J. 30: 709-715 (1936)

BLUMENBERG, F.-W. und W. SCHEEF: Hochdosierte Cyclophosphamidbehandlung bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorerkrankungen.
Med. Welt 1969: 2024-2030 (1969)

BOLT, W., F. RITZL und H. NAHRMANN: Untersuchungen mit einem tritiummarkierten N-Lost-Derivat in der Karzinombehandlung.
Strahlenforsch. und Strahlenbehandl. 4: 166-170 (1963)

BORIES F., M.P. RENERRE and P. ROUGEOT: Cyclophosphamide (Endoxan^{R}) Metabolism in the Rabbit. Metabolic Balance and Elimination Kinetics in Different Tissues and Organs Following oral Administration. J. Animal Science 36/5: 931-935 (1970)

BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung cyclischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapia. Arzneim.-Forsch. 8: 1-9 (1958)

BROCK, N.: Pharmakologische Untersuchungen mit Trofosfamid (Ixoten^{R}), einem neuen Oxazaphosphamidoxid. Med. Mschr. 27: 390-394 (1973)

BROCK, N. und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzneim.-Forsch. 13: 1021-1031 (1963)

BROCK, N. und H. WILMANNS: Wirkung eines cyclischen N-Lost-Phosphamidester auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte. Chemotherapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Eigenschaften von B 518 Asta. Dtsch. Med. Wschr. 83: 453-458 (1958)

BURCHENAL, J.H., R.A. LESTER, J.B. RILEY and C.P. RHOADS: Studies on the Chemotherapy of Leukemia. (I) Effect of certain Nitrogen mustards and Carbamates on transmitted mouse leukemia. Cancer 1: 399-412 (1948)

CHAUBE, S., G. KURY and M.L. MURPHY: Teratogenic Effects of Cyclophosphamide (NSC-26271) in the Rat. Cancer Chemother. Rep. 51: 363-376 (1967)

CLARDY, J.C., J.A. MOSBO and J.G. VERKADE: Crystall and Molecule Structure of Cyclophosphamide. J. Chem. Soc., Chem. Comm. 20: 1163-1164 (1972)

CLAUSSEN,U. und C.D. BROEDERSDORFF: Zur teratogenen Wirkung von 6-Amino-nicotinsäureamid bei Kaninchen nach Injektion in den Dottersack. Z. Anat. Entwicklungsgesch. 145: 67-73 (1974)

CLAUSSEN, U. und H.-W. BREUER: The Teratogenic Effects in Rabbits of Doxycycline, Dissolved in Polyvinylpyrrolidone, Injected into the Yolk Sac. Teratology 12: 297-302 (1975)

COATES,A.: Cyclophosphamide in Pregnancy. Aust. N.Z.J. Obstet Gynaec. 10: 33-34 (1970)

COHEN, J.L., J.Y. JAO and W.J. JUSKO: Pharmakokinetic of Cyclophosphamide in man. Brit. J. Pharmacol. 43: 677-680 (1971)

CONNORS, T.A., P.J. COX, P.B. FARMER, A.B. FOSTER and M. JARMAN: Some Studies of the Active Intermediates Formed in the Microsomal Metabolism of Cyclophosphamide and Isophosphamide. Biochem. Pharmacol. 23: 115-129 (1973)

DARLINGTON, C.D. and P.C. KOLLER: The Chemical Breakage of Chromosomes.
Heredity 1: 187-221 (1947)

DATTA, P.K. und E. SCHLEIERMACHER: The Effects of Cytoxan on the Chromosomes of Mouse Bone Marrow.
Mutation Res. 8: 623-628 (1969)

DIDCOCK, K., D- JACKSON and J.M. ROBSON: The Action of some Nucleotoxic Substances on Pregnancy.
Brit. J. Pharmacol. 11: 437-41 (1956)

DIAMOND, I., M. ANDERSON and S.R. Mc CREADIE: Transplacental Transmission of Myleran in a Mother with Leukemia. Production of fetal Malformation and Cytomegaly.
Pediatrics 25: 85 (1960)

DIXON, M. and D.M. NEEDHAM: Biochemical Research on Chemical Warfare Agents.
Nature 158: 432-438 (1946)

DOLD, U.W. und H.J. GAERTNER: Das pharmakokinetische Verhalten von Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) im menschlichen Organismus.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78: 169-172 (1972)

DOSTAL, M.: Morphogenesis of Cleft Palate Induced by Exogenous Factors. III. Intraamniotic Applikation of Hydrocortisone in Mice.
Teratology 4: 63-68 (1970)

DUBOIS-FERRIERE, H.: Die Therapie des Morbus Hodgkin. Monographie der Arbeitstagung "Chemo-und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome" in Wien (1969).

ELMORE, D.T., J.M. GULLAND, D.O. JORDAN and H.F.W. TAYLOR: The Reaktion of Nucleic Acids with Mustard gas.
Biochem. J. 42: 308-316 (1948)

FELL, H.B. and C.B. ALLSOPP: The Action of Mustard gas (ß,ß'dichlorodiethyl-sulphide) on Living Cells in Vitro (I, II).
Canc. Res. 8: 145-161 (1948)

FRIEDMAN, O.M. and E. BOGER: Colorimetric Estimation of Nitrogen Mustard in Aqueous Media.
Anal. Chem. 33: 906-910 (1961)

FRIEDMAN, O.M. and A.M. SELIGMAN: Preparation of N-phosphorylated Derivatives of Bis-(ß-chlorethyl)-amine.
J. Amer. Chem. Soc 76: 655-685 (1954)

FRITZ, H. und R. HESS:Effects of Cyclophosphamide on Embryonic Development in the Rabbit.
Agents and Actions 2/2: 83-86 (1971)

GEBHARDT, D.O.E.: The Embryolethal and Teratogenic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Embryos. Teratology 3: 273-278 (1970)

GEBHARDT, D.O.E.: Gaumenspalten und/oder Oligodaktylien beim Embryo der Maus, hervorgerufen an verschiedenen Tagen der Gravidität durch unterschiedliche Dosen von Röntgenstrahlen oder Cyclophosphamid.
Acta Morphol. Neerl. Scand. 8: 240-241 (1971)

GERHARDS, H.J. und E.H. GRAUL: Autoradiographische Untersuchungen über die Verteilung von H^3-Cyclophosphamid in der Ratte.
Arzneim.-Forsch. 20: 601-607 (1970)

GERLINGER, P., J.V. RUCH, R. COURRIER et J. CLAVERT: Vorläufige Mitteilung über die Wirkung von Cyclophosphamid (Endoxan) auf die Entwicklung des Embryos.
C. R. Acad. Sci. 255:3229-3231 (1962)

GERLINGER, P.: Contribution a L'Etude de L'Action teratogene du Cyclophosphamide chez L'embryon de Poulet et de Lapin.
C.R. Soc. Biol. 157: 249-317 (1963)

GERLINGER, P. et J.V. RUCH: Herzmißbildungen bei Hühnerembryonen, die mit Cyclophosphamid behandelt wurden.
C. R. Soc. Biol. 158: 825-828 (1964)

GIBSON, J.E. and B.A. BECKER: The Teratogenicity of Cyclophosphamide in Mice.
Cancer Res. 28: 475-480 (1968a)

GIBSON, J.E. and B.A. BECKER: Teratogenicity of various Metabolites of Cyclophosphamide in Mice.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 14: 639-640 (1969)

GIBSON, J.E. and B.A. BECKER: Effect of Phenobarbital and SKF 525-A on Placental Transfer of Cyclophosphamide in Mice.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 177: 256-262 (1971a)

GIL GAYARRE, M. J. LARRUGA REY and C. GIL GAYARRE: Effect of Genoxal on the Development of various Neoplasias. Arch. Fac. Med. Madrid 5: 353-357 (1964)

GILETTE, R. and D. BODENSTEIN: Secific Development Inhibition Produced in Amphibian Embryos by a Nitrogen Mustard Compound. J. Exp. Zool. 103: 1-32 (1946)

GILMAN, A. and F.S. PHILIPS: The Biological Actions and Therapeutic Applications of the (ß-chloroethyl)-amines and sulphides. Science 103: 409-415 (1946)

GOLDTWAIT, D.A.: Effect of Nitrogen Mustard on Nucleid Acid Metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 80: 503-504 (1952)

GOODMAN, L.S., M.M. WINTROBE, W. DAMESHEK, M.J. GOODMAN, A. GILMAN and M.T. Mc LENNAM: Nitrogen Mustard Therapy. J. Amer. Med. Ass. 132: 126-132 (1946)

GOTTSCHEWSKI, G.H.M.: Das Entstehen bestimmter äußerer Mißbildungen als Folge exogener Reize beim Säugetier. Med. Welt II: 2545-2556 (1963)

GOTTSCHEWSKI, G.H.M. und H. ZIMMERMANN: Wirkungsmechanismus teratogener Stoffe. Naturwissenschaften 50: 525 (1963)

GRAUL, E.H.: Radiotracer-Untersuchungen bei pharmakokinetischen Studien mit Cyclophosphamid
Dtsch. Ärztebl. 66: 1739-1743 (1969)

GREENBERG, L.H. und K.R. TANAKA: Congenital Anomalies Probably Induced by Cyclophosphamide.
J. Amer. Med. Ass. 188: 423-426 (1964)

HACKENBERGER, I. und T. von KREYBIG: Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und der Ratte.
Arzneim.-Forsch. 15: 1456-1460 (1965)

HASKIN, D.: Some Effects of Nitrogen Mustard on the Development of External Body Form in the Fetal Rat.
Anat. Rec. 102: 493-511 (1948)

HERMANN, G.R.: The Clinical Pathology of Mustard gas (dichlorodiethylsulphide) poisoning.
J. Lab. Clin. Med. 4 : 1-18 (1918)

HETTIG, R.A., G.G. ROBERTSON and D.T. CLINE: Effects of Nitrogen Mustard Injektions on the Embryos of Pregnant Rat.
J. Lab. Clin. Med. 36: 833-834 (1950)

HILL, D.L., W.R. LASTER Jr. and R.F. STRUCK: Enzymatic Metabolism of Cyclophosphamide and Nicotine and Production of a Toxic Cyclophosphamide Metabolite.
Canc. Res. 32: 658-665 (1971)

HOHORST, H.J., A. ZIEMANN und N. BROCK: Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid.
Arzneim.-Forsch. 15: 432-434. (1965)

KARNOFSKY, D.A., J.H. BURCHENAL, R.A. ORMSBEE, I. CORNMAN and C.P. RHOADS: Experimental Observation on the Effects of the Nitrogen Mustards on Neoplastic Tissues.
Canc. Res. 7: 50-51 (1947)

KARNOFSKY, D.A., W.H. ABELMANN, F.L. CRAVER and J.H. BURCHENAL: The Use of the Nitrogen Mustards in the Palliative Treatment of Carcinoma. With Particular Reference to Bronchogenic Carcinoma.
Cancer I: 634-657 (1948)

KARNOFSKY, D.A. and C.R. LACON: Overview of the Cancer Chemotherapy Service Center about the Teratogenic Effect of Chemotherapeutica in Chicken Embryos.
Cancer Res. 22: 84-86 (1962)

KENIS, Y., P. DUSTIN, J. HENRY et H.J. TAGNON: Action du Myleran dans 22 Cas de Leucemie Myeloide Chronique.
Rev. Franç. Etude Clin. Biol. I: 435 (1956)

KINI, P.M., S. SIVAKUMAR and K.N. PAI: Cyclophosphamide at Treatment of Malignant Diseases.
J. Indian M. A. 45: 195-200 (1965)

KLINKE, F., E. LISS und G. PALME: H^3-Cyclophosphamid: Verteilungskinetik und DNS-Bindung. 2. Jahrestagung der Gesellschaft für Nuklearmedizin in Heidelberg, 22.-24. Okt. 1964, S. 47-53

KLINKE, F.: Untersuchungen über die Bildung von Umwandlungsprodukten des Cyclophosphamids und ihren Einfluß auf isolierte Ascites-Tumorzellen. Inaug. Diss. Freie Universität Berlin (1969)

KNÖRR, K., H. KNÖRR-GÄRTNER und B. UEBELE-KALLHARDT: Zur Frage der Wirkung alkylierender Substanzen auf die Entwicklung der Frucht. Geburtsh. und Frauenheilk. 29: 601-611 (1969)

KRAHE, M.: Die Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch Zytostatika. Geburtsh. und Frauenheilk. 23: 675-676 (1962)

v. KREYBIG, T.: Extremitätenmißbildungen im Tierexperiment. Z. Krebsforsch. 64: 46-50 (1965)

v. KREYBIG, T. und W. SCHMIDT: Zur chemischen Teratogenese bei der Ratte. Arzneim.-Forsch. 16: 989-1001 (1966)

v. KREYBIG, T.: Phasenspezifizität und organotrope Wirkungen im teratologischen Experiment. Arch. exp. Path. Pharm. 253: 59-60 (1966)

KRUMBHAAR, E.B.: Role of the Blood and Bone Marrow in certain Form of Gas Poisoning. (I) Peripheral Blood Changes and their Significance. J. Amer. Med. Ass. 72: 39-43 (1919)

LACHER, M.J. and W. GELLER: Cyclophosphamide and Vinblastinsulphate at Lymphogranulomatosis during Pregnancy.
J. Amer. Med. Ass. 195: 486-488 (1966)

LAW, L.W.: The Production of Tumors by Injektion of a Carcinogen into the Amniotic Fluid of Mice. Science 91: 96-97 (1940)

LISS, E., H. SCHMIDT, E. SCHAUMLÖFFEL und G. PALME: Alkylierung der DNA verschiedener Tumorzellarten nach in vivo Gabe von Cyclophosphamid. Z. Krebsforsch, 80: 239-245 (1973)

LOPES CARDOZO, E.: Zytostatische Therapie.
De Erven F. Bohn N.V. Band 51 (1964)

LOWRENCE, P.B. and C.E. CARTER: The Effect of Nitrogen Mustard in the Metabolism of Nucleic Acids in the Hematopoietic Tissue of the Rabbit. L. Cell. Physiol. 35: 387-401 (1950)

MELLET, L.B.: Resorption and Trial of Tritium-labeled Cyclophosphamide in dog.
Fed. Proc. 22: 864 (1963)

METHA, A. and R.M. VAKIL: Administration of Cyclophosphamide in a Case of Lymphosarkomatosis by Pregnancy during the 3. Trimenon. Indian J. Cancer Bombay 3: 196-202 (1966)

MEYER, V.: Über Thioglykolverbindungen. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 19: 3259-3266 (1886)

MIRKIN, B.L.: Maternal and Fetal Distribution of Drugs in Pregnancy. Clin. Pharmacol. Ther. 14: 643-647 (1973)

MONIE, I.W.: Chlorambucil-Induced Abnormalities of the Urogenital System of Rat Fetuses. Anat. Rec. 139: 145-153 (1961)

MUNSCH, N., A.M. DE RECONDO and C. FRAYSSINET: Effects of Acrolein on DNA-Synthesis in Vitro. Febs. Letters 30/3: 286-290 (1973)

MURPHY, M.L.: Teratogenic Effects of Tumour Inhibiting Chemicals in the Foetal Rat. Ciba Foundation, Symposium Congenital Malformations. J. and A. Churchill, edit. London, (1960)

MURTHY, V.V., B.A. BECKER and W.J. STEELE: Effects of Dosage of Phenobarbital and 2-Diethylaminoethyl-2,2-diphenylvaleriat on the Binding of Cyclophosphamide and/or its Metabolites at DNA, RNA and Protein of the Embryo and the Liver of Pregnant Mice. Cancer Res. 33: 664-670 (1973)

NETTER-LAMBERT, A., C. BOUZIGNAC et A. NETTER: Amenorrhoee et Busulfan (Myleran): Effet Nocil des Substances Radiomimetiques sur les Ovaires. Presse Med. 71: 2285 (1963)

NORPOTH, K., H.W. ADDICKS und U. WITTIG: Quantitative Bestimmung alkylierender Zytostatika auf der DC-Platte mit 4-Pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolylhydrazon (PHB). Arzneim.-Forsch. 23: 1529-1535 (1975)

PAPPENHEIMER, A.M. and M. VANCE: The Effects of Intravenous Injektions of Dichlorroethylsulphide in Rabbits, with Special Reference to its Leukotoxic Action. J. Exp. Med. 31: 71-94 (1920)

RHOADS, C.P.: Nitrogen Mustard in the Treatment of Neoplastic Disease. J. Amer. Med. Ass. 131: 656-658 (1946)

RÖHRBORN, G.: Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. Humangenetik 1: 205-231 (1965)

RÖHRBORN, G. und F. VOGEL: Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. Dtsch Med. Wschr. 92: 2315-2321 (1967)

ROSS, W.C.J.: The Chemistry of Cytotoxic Alky-lating Agents. Advances in Cand. Res. I:397-449 (1953)

RÖTTGER, U.: Vergleichende isotopentechnische Untersuchungen über den Metabolismus von Cyclophosphamid bei oraler und intravenöser Applikation an Patienten. Inaug.-Diss. Marburg/Lahn (1970)

RUTENBERG, A.M., L. PERSKY, O.M. FRIEDMAN and A.M. SELIGMAN: Toxicity in Mice of New Secondary Nitrogen Mustards. J. Pharm. Exp. Therap. 111: 483-488 (1954)

SALZGEBER, B.: Sur la Produktion Experimentale de Phocomeles chez l'Embryon de Poulet a l'Aide d'Yperite a l'Azote. C.R. Acad. Sci 254:3591 (1962)

SALZGEBER, B.: a) Production elective de Phokomelie sous l'Influence d'Yperite azotee. J. Embryol. Exp. Morph. 11:413-429 (1963) b) Action feminissante de l'Yperite azotee sur le testicule de l'Embryon de poulet. C.R. Acad. Sci. 257: 754 (1963)

SCHMIDT, W., D.T. ARAKAKI, N.A. BRESLAU und J.C. CULBERTSON: Chemical Mutagenesis: The Chinese Hamster Bone Marrow as an in Vivo Test System. I. Cytogenetic Results on Basis Aspects of the Methodology obtained with Alkylating Agents. Humangenetik 11: 103-118 (1970)

SCHROERS, H.J.: Untersuchungen zum embryotoxischen Wirkprinzip von Cyclophosphamid. Dissertation in Vorbereitung

SCOTT, W.J.: Effects of Intrauterine Administration of Acetazolamine in Rats. Teratology 3: 261-268 (1970)

SHOJI, R. and E. OHZU: Some Aspects of the Effect of Endoxan on Developing Mouse Embryos. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool 15: 662-665 (1965)

SHORT, R.D. and J.E. GIBSON: Protein Half-Lives in neonatal Mice after a Toxic Dose of Cyclophosphamid. Experientia 30: 397-399 (1974)

SINGH, S., S.M. TULI and P.K. GUPTA: Skeletal Defects Induced by Cyclophosphamide (Endoxan-Asta) in Chick Embryos - Preliminary Report. Acta orthop. Scandinav. 42: 217-226 (1971)

SINGH, S.: The Teratogenicity of Cyclophosphamide (Endoxan-Asta) in Rats. J. Med. Res. 59: 1128-1135 (1971)

SLADEK, N.E.: Bioassay and Relative Cytotoxic Potency of Cyclophosphamide Metabolites Generated in Vitro and in Vivo. Canc. Res. 33: 1150-1158 (1973)

SOLLMANN, T.: Dichlorethylsulphid (Mustard Gas). The Influence of Solvents, Adsorbens and Chemical Antidotes on the Severity of Human Skin Lesions. J. Pharm. Exp. Therap. 12: 303-318 (1919)

STEINER, B., H. ARNOLD, E.H. GRAUL, H. BEKEL, H. HUNDESHAGEN und H. WILMANNS: Zur Synthese von tritium-markiertem Cyclophosphamid (einem Krebschemotherapeutikum) hoher spezifischer Aktivität.
Atompraxis: 358-360 (1964)

STERZ, H. und H. NOTDURFT: Routine X-ray Pictures of the Skeletons of Rabbit Fetuses of Day 31 post conceptionem versus 3-dimensional Preparations.
Teratology 12: 335 (1975)

TRASLER, D.G., B.E. WALKER and F.C. FRASER: Congenital Malformations produced by Amniotic-Sac Punctures. Science 124: 439 (1956)

TURBOW, M.M. and J.G. CHAMBERLAIN: Direct Effects of 6-Aminonicotinamide on the Developing Rat Embryo in Vitro and in Vivo.
Teratology 1: 103-108 (1968)

VOELCKER, G., U. DRAEGER, G. PETER und H.J. HOHORST: Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.
Arzneim.-Forsch. 24/8: 1172-1176 (1974)

VOGEL, F. und P. JÄGER: Die genetische Belastung einer menschlichen Bevölkerung aufgrund von Zytostatika.
Humangenetik 7: 287-304

WAGNER, W.D.: Fehlbildungen bei Kaninchen nach hyperbarer Oxygenation.
Diss. Med. Fak. Düsseldorf (1972)

WINTROBE, M.M. and C. HUGULEY: Nitrogen Mustard Therapy for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, the Leukemias and other Disorders. Cancer 1: 357-382 (1948)

Herrn Prof. Dr. G. R ö h r b o r n danke ich für die Überlassung des Inaugurationsthemas und für seine richtungsweisenden Vorschläge.

Herrn Dr. U. C l a u s s e n bin ich für seine freundliche Unterstützung und stets wohlwollende Haltung in tiefer Dankbarkeit verbunden.

Herrn Prof. Dr. H. K r ö n e r und Herrn Dr. H a a s danke ich für die freundliche Bereitstellung des FLUORISPEC-Fluoreszenz-Spektrometers der Firma BAIRD-ATOMIC.

LEBENSLAUF

Am 11. April 1953 wurde ich als Sohn des Eisenhütten-Ingenieurs Norbert Krengel und seiner Ehefrau Johanna, geb. Hüttemeister, in Duisburg-Hamborn geboren.
Im April 1959 wurde ich in die Moerser Volksschule Kastell eingeschult. Nach vier Volksschuljahren wechselte ich im April 1963 zum Staatlichen Gymnasium Adolfinum, Moers über. Hier legte ich im Mai 1971 die Reifeprüfung ab.
Im Oktober des gleichen Jahres begann ich das Studium der Medizin an der Rijksuniversiteit Gent in Belgien. Nach der Prüfung zur 1. Kandidatuur in Belgien setzte ich mein Studium an der Universität Düsseldorf fort und legte im März 1975 die ärztliche Vorprüfung ab. 1976 bestand ich den 1. Teil, 1978 den 2. Teil der ärztlichen Prüfung.
Im Sommersemester 1975 begann ich mit Untersuchungen zur Embryotoxizität von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf.